

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii

Damian Mikulski

Teoretyczne badanie biofizykochemicznych
właściwości resweratrolu
i jego pochodnych

Theoretical study of biophysicochemical properties
of resveratrol and its derivatives

Praca doktorska
Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem
Prof. UAM dr. hab. Marcina Molskiego
Zakład Chemii Teoretycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza

Poznań, 2010

Panu Profesorowi dr. hab. Marcinowi Molskiemu składam serdeczne podziękowania za rozbudzenie we mnie zainteresowania chemią kwantową i mechaniką kwantową, za cenną pomoc w zgłębianiu jej tajników oraz za okazaną cierpliwość i dużo życzliwości.

Podziękowania składam **Profesorowi dr. hab. Jerzemu Konarskiemu** za cenne wskazówki, nieocenioną i profesjonalną pomoc przy interpretacji wyników oraz metodologii obliczeń.

Dziękuję **Profesorowi dr. hab. Markowi Kręglewskiemu, Koleżankom i Kolegom z Zakładu Chemii Teoretycznej** za pomoc i życzliwość.

Serdeczne podziękowania kieruję dla **Pani inż. Malgorzaty Szeląg** za życzliwość i wielką pomoc w przygotowaniu niniejszej rozprawy.

Podziękowania również kieruję do **dr. Tomasza Grabkiewicza** za pomoc podczas obliczeń i poświęcony dla mnie czas.

Dziękuję również moim **Rodzicom** za duchowe wsparcie podczas pisanie rozprawy.

OZNACZENIA

AIP – adiabatyczny potencjał jonizacyjny (*Adiabatic Ionization Potential*)

BDE – entalpia dysocjacji wiązania (*Bond Dissociation Enthalpy*)

BSSE – błąd superpozycji bazy (*Basis Set Superposition Error*)

COSMO – model solwatacyjny (*Conductor-like Screening Model*)

CP – metoda zwana *Couterpoint Method*

C-PCM – model solwatacyjny (*Conductor-Polarizable Continuum Model*)

CR – *cis*-resweratrol

DHS – dihydroksystilben

DNP – podwójna numerycznie baza z funkcjami polaryzacyjnymi (*Double Numeric Basis Set with Polarization Functions*)

ET – mechanizm transferu elektronu (*Electron Transfer*)

HAT – mechanizm transferu atomu wodoru (*Hydrogen Atom Transfer*)

HF – metoda Hartree'a-Focka

HOMO – najwyższy nieobsadzony orbital molekularny (*Highest Occupied Molecular Orbital*)

MP2 – drugi rząd rachunku perturbacyjnego Møllera-Plesseta

MP4 – czwarty rząd rachunku perturbacyjnego Møllera-Plesseta

PC – piceatannol

PDE – entalpia dysocjacji protonu (*Proton Dissociation Enthalpy*)

PES – powierzchnia energii potencjalnej (*Potential Energy Surface*)

PT – mechanizm transferu protonu (*Proton Transfer Mechanism*)

RR – reduktaza rybonukleotydowa

THS – trihydroksystilben

TR – *trans*-resweratrol

TS – stan przejściowy (*Transition State*)

ZPE – energia drgań zerowych (*Zero-Point Energy*)

郑VC – poprawka wibracyjna punktu zerowego (*Zero-Point Vibrational Correction*)

SPIS TREŚCI

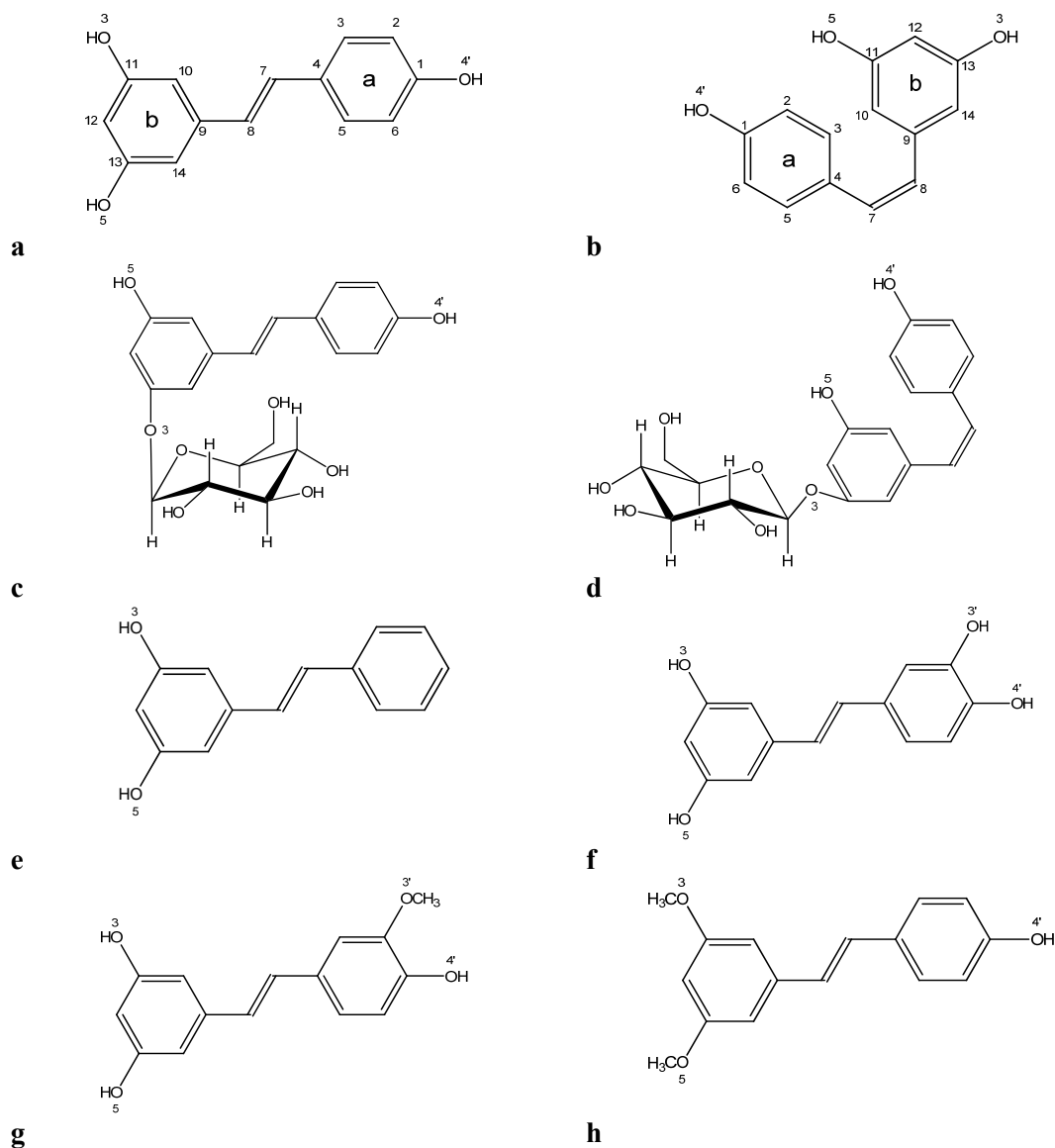
1. Wstęp	9
1.1. Występowanie stilbenoidów w przyrodzie i ich charakterystyka ogólna	9
1.2. Właściwości przeciwutleniające, przeciwlipemiczne i kardioprotekcyjne TR oraz innych stilbenoidów	19
1.3. Aktywność antynowotworowa TR i jego pochodnych	26
1.4. Aktywność przeciwzapalna TR i jego pochodnych	31
1.5. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa TR	32
1.6. TR jako substancja antyproliferacyjna oraz czynnik indukujący apoptozę	33
1.7. Eksperymentalne i teoretyczne badanie struktury i właściwości antyoksydacyjnych TR oraz jego pochodnych	40
1.8. Oligomery oraz glukozydy TR wyizolowane z wina, owoców winorośli <i>Vitis vinifera</i> i orzecha ziemnego (<i>Arachis hypogaea</i>)	43
1.9. Badania <i>in silico</i>	48
2. Cele rozprawy doktorskiej	50
3. Podstawy teoretyczne metod kwantowo-mechanicznych	51
3.1. Układy otwartopowłokowe i problem kontaminacji spinowej	51
3.2. Metoda rachunku zaburzeń Møllera-Plesseta	54
3.3. Funkcjonały korelacyjno-wymienne	57
3.3.1. Funkcjonały gradientowe	60
3.3.2. Funkcjonały gradientowe wysokiego rzędu	61
3.3.3. Funkcjonały hybrydowe	63
3.4. Dziury wymienne i korelacyjne w metodzie DFT	63
3.5. Błąd superpozycji bazy	65
4. Metodologia obliczeń kwantowych i wyniki	66
4.1. Struktura stereoizomerów resweratrolu, ich rodników tlenowych oraz anionów w próżni, medium wodnym i etanolowym	77
4.2. Analiza geometryczna <i>trans</i> -piceatannolu za pomocą metod DFT i MP2	85
4.3. Bariera rotacyjna dla TR w próżni, medium wodnym oraz etanolowym	86
4.4. Analiza geometryczna i energetyczna hydroksylowych pochodnych TR i CR oraz ich rodników i kationorodników	90
4.5. Struktura hydroksylowych i metoksyłowych pochodnych TR	92
4.6. Struktura oligomerów, glukozydów, siarczanów(VI) TR oraz ich rodników tlenowych	94
4.7. Struktura polifenoli wyizolowanych z orzecha ziemnego (<i>Arachis hypogaea</i>)	100
4.8. Strukturalna i energetyczna analiza kompleksów TR–Cu(II) oraz CR–Cu(II)	100
4.9. Strukturalna i energetyczna analiza akwakompleksów TR z Cu(II)	103
4.10. Oddziaływanie kompleksów TR–Cu(II) z fosfolipidem	105
4.11. Oddziaływanie TR z dinukleotydem DNA	108
4.12. Kompleksy TR–Cu(II)–5'-monofosforan(V) tymidyny oraz TR–	114

Cu(II)(H ₂ O) ₄ -5'-monofosforan(V) tymidyny	
4.13. Oddziaływania wodorowe w kompleksach TR-H ₂ O	118
4.14. Analiza termodynamiczna rodnikowej inhibicji reduktazy rybonukleotydowej przez TR, PC oraz hydroksymocznik	121
4.15. Zależność struktura – aktywność antyoksydacyjna TR w próżni, medium wodnym i etanolowym	126
4.16. Zależność struktura – aktywność antyoksydacyjna hydroksylowych pochodnych TR i CR	136
4.17. Zależność struktura – aktywność antyoksydacyjna oligomerów, glukozydów oraz siarczanów(VI) TR	139
4.18. Zależność struktura – aktywność antyoksydacyjna polifenoli z orzecha ziemnego (<i>Arachis hypogaea</i>)	145
4.19. Zależność struktura – aktywność antyoksydacyjna metoksyłowych pochodnych TR i PC	146
5. Wnioski	147
6. Literatura	180

1. WSTĘP

1.1. Występowanie stilbenoidów w przyrodzie i ich charakterystyka ogólna

Badania ostatnich lat dowodzą, że istnieje ścisły związek pomiędzy konsumpcją owoców i warzyw, a ich wpływem na zdrowie człowieka. Udowodniono, że dieta bogata w te produkty zmniejsza ryzyko chorób układu krążenia, zachorowalność na nowotwory i – w efekcie – umieralność. Wykazano, że wiele różnych związków chemicznych występujących w przyrodzie jest odpowiedzialnych za prewencyjne i lecznicze działanie owoców i warzyw. Wśród nich największą aktywność biologiczną wykazują flawonoidy oraz stilbenoidy. Jest to szeroka klasa związków, która wykazuje silną aktywność biologiczną i medyczną. Stilbenoidy należą do substancji będących pochodnymi hydroksylowymi stilbenu, który w przyrodzie występuje głównie w formie stereoizomeru *trans*. Zaliczamy do nich izoflawony, ligniny, kumestany i polifenole. Podstawowym elementem strukturalnym stilbenoidów jest szkielet *trans*-stilbenowy oraz grupy hydroksylowe w dwóch pierścieniach fenyłowych. Układ winylowy zapewnia pełną koniugację pierścieni fenyłowych. Do najbardziej znanych polifenoli stilbenowych pochodzenia naturalnego należą: TR, CR, *trans*- i *cis*-piceid, pinosylwina, PC, rapontygenina oraz pterostilben (**Rys. 1.1.1.**). W **Tabeli 1.1.1.** podano główne źródła TR oraz innych stilbenoidów występujących w przyrodzie, a także w produktach żywnościowych. Główne źródła tych związków to: winogrona, orzechy ziemne, owoce morwy oraz różne gatunki borówek. Ostatnie doniesienia wskazują na obecność stilbenoidów w skórce pomidora [1] i w wyciągach z ciemnej czekolady [2]. Jako ciekawostkę można podać fakt, że niektóre triacylowe pochodne polifenoli stilbenowych wyizolowano z czerwonej gąbki (*Kirkpatrickia variolosa* i *Myxillideae*). Stilbenoidy odkryto również w szyszkach chmielu [3], w których zawartość TR określono na poziomie 5-16 mg/kg, natomiast zawartość *trans*-piceidu na poziomie 4-9 mg/kg. Spośród wszystkich stilbenoidów najwięcej doniesień dotyczy TR – związku o najwyższej aktywności biomedycznej, który obecnie przeżywa renesans zainteresowania wielu grup badawczych na całym świecie.



Rys. 1.1.1. Polifenole stilbenowe naturalnego pochodzenia: a) *trans*-resweratrol (TR), b) *cis*-resweratrol (CR), c) *trans*-piceid, d) *cis*-piceid, e) pinosylwina, f) piceatannol (PC), g) raponitygenina, h) pterostilben

TR (*trans*-4',3,5-trihydroksystilben, 5-[(1E)-2-4-hydroksyfenylo]winylo]benzeno-1,3-diol, **Rys. 1.1.1.a**) jest białą, krystaliczną substancją, bardzo słabo rozpuszczalną w wodzie (rozpuszczalność w temp. 298,2 K wynosi 0,000387g/100g H₂O), natomiast bardzo dobrze rozpuszczalną w etanolu (rozpuszczalność w temp. 298,2 K wynosi 85,118g/100g etanolu), DMSO oraz dimetyloformamidzie [4] Uzyskane wyniki dowodzą, że TR jest substancją w dużym stopniu hydrofobową, której rozpuszczalność w wodzie jest nawet mniejsza od rozpuszczalności fenolu (9,2 g/100g H₂O w temp. 298 K). TR łatwo ulega fotoizomeryzacji do stereoizomeru *cis* (**Rys. 1.1.1.b**). Ponadto izomer *trans* charakteryzuje się fluorescencją, podczas gdy *cis* praktycznie nie fluoryzuje. Izomer *trans* charakteryzuje się też dużą niestabilnością termiczną i już w temperaturze pokojowej może ulec termoindukowanej izomeryzacji,

prowadzącej do stereoizomeru *cis*. Ponadto wykazano, że w środowisku o wysokim pH, TR bardzo łatwo ulega przekształceniu w CR [5]. Przeprowadzone badania dowodzą, że istnieje różnica w aktywności biologicznej stereoizomerów *cis* i *trans*, przy czym TR jest bardziej aktywną formą [6,7]. Badania pozostałych stilbenoidów również wykazały, że stereoizomery *trans* wykazują inną aktywność biologiczną, niż stereoizomery *cis*. Na przykład: TR ma większe zdolności do indukowania apoptozy w leukocytach HL-60 niż CR [6] oraz jest silniejszym inhibitorem cyklooksygenazy (COX-1) w porównaniu z CR [7]. Bazując na danych spektroskopowych, otrzymanych dla TR w roztworze etanolowym stwierdzono, że związek ten wykazuje maksymalną absorpcję przy 308 nm, podczas, gdy *cis*-stereoizomer przy 288 nm. Następnie rozdzielono te stereoizomery za pomocą metody HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Wykonując badania spektroskopowe w roztworze wodnym i etanolowym stwierdzono, że TR wykazuje największą absorpcję promieniowania UV w etanolu. Ponadto na podstawie wykonanego widma NMR stwierdzono znaczące różnice w przesunięciu pików, co pozwoliło rozróżnić badane stereoizomery [8]. Trela oraz Waterhouse [9] zbadali stabilności TR w różnych warunkach fizykochemicznych. Stwierdzili, że TR jest trwały przy braku światła i w roztworze buforu o wysokim pH. Autorzy wykazali również, że izomer *cis* jest szczególnie wrażliwy na światło, ale pozostaje wyjątkowo stabilny przechowywany przez 35 dni w ciemności w roztworze etanolu. Badania ujawniły również, że niskie pH przyczynia się do izomeryzacji *cis* w *trans*. Deak i Falk [8] studiowali trwałość i fotochemię stereoizomerów resweratrolu. Ich badania pokazały, że TR jest trwalszy od izomeru *cis* o około 11 kcal/mol. Natomiast obliczona bariera rotacyjna dla tych związków wynosiła około 14 kcal/mol. W pracy tej również wyznaczono stałe dysocjacji TR, odpowiadające deprotonacji poszczególnych protonów z grup hydroksylowych. Wartości pK_a (ujemny logarytm dziesiętny ze stałej dysocjacji kwasowej) otrzymane dla monoanionu oraz dianionu wynosiły odpowiednio 9,3 i 10,0. Na podstawie tych wartości autorzy jednoznacznie dowiedli, że proton z grupy 4'-OH jest najbardziej kwasowy. Stwierdzono również, że dominującą formą resweratrolu w surowcach naturalnych jest izomer *trans*, natomiast obecność w czerwonym winie stereoizomeru *cis* może być związana z występowaniem enzymów powstających podczas fermentacji, które katalizują konwersję *trans*–*cis*. Autorzy sugerują również, że stereoizomer *cis* może być uwalniany w wyniku powolnego rozkładu oligomerów resweratrolu. W ostatnich latach opracowano metody pozwalające na wyodrębnienie TR z ekstraktów roślinnych. Okazało się, że metoda HPLC [10], HPTLC [11] oraz chromatografia gazowa (GC – *Gas Chromatography*) [12] są najbardziej adekwatne do tego celu, ponieważ ekstrakty, oprócz resweratrolu, zawiera-

ją szereg innych stilbenoidów oraz ich kompleksy z cukrami i garbnikami. Głównie stosowano metodę HPLC z kolumną zawierającą odwróconą fazę oraz detektor promieniowania UV. Metoda ta jest szczególnie zalecana, gdyż możemy za jej pomocą rozdzielić nie tylko mieszaninę, ale również oznaczyć jej skład na podstawie różnic wartości absorbancji składników mieszaniny. Wykazano również że użycie spektrometrii masowej, fluorymetrii oraz metod elektrochemicznych zdecydowanie poprawia możliwości detekcji pochodnych resweratrolu w złożonych mieszaninach.

Chemicznie TR powstaje na drodze przemian kwasu cynamonowego. Podobny szlak syntezy występuje w obszernej klasie związków zwanych flawonoidami. Zasadniczym etapem syntezy TR jest kondensacja cząsteczki *p*-kumarylo-CoA i trzech cząsteczek malonylo-CoA [13]. Reakcja ta jest katalizowana przez syntazę resweratrolu. W zależności od budowy wyjściowego substratu mogą powstawać różne pochodne hydroksylowe *trans*-stilbenu. Powstałe na kolejnych etapach syntezy związki mogą ulegać następnie reakcjom glikozydacji, metylacji i kondensacji, w wyniku której powstają oligomeryczne pochodne TR, zwane winiferynami [14]. Ostatnie badania pokazują, że TR może tworzyć dimery, trimery, a nawet tetramery i pentamery [15-17]. Spośród nich najważniejsze to: pallidol, *trans*- ϵ -winiferyna, α -winiferyna (suffruticosol B), *cis*- ϵ -winiferyna, *trans*- δ -winiferyna-A, *trans*- δ -winiferyna-B oraz gnetina H (**Rys. 1.1.2.**). Związki te występują głównie w skórkach czerwonych winogron i czerwonym winie oraz w owocach *Vitis vinifera*.

W surowcach roślinnych występują też różnorodne glikozydy TR. Na szczególną uwagę zasługują O-glikozydy i O-fruktozydy. Z rośliny *Hopea atilis* C udało się także wyizolować glikozyd resweratrolu [15]. Spośród wszystkich glikozydów najwięcej doniesień literaturowych dotyczy silnie bioaktywnego *trans*-piceidu (**Rys. 1.1.1.c**) – jednego z aktywnych składników czerwonych win [16,17]. W winogronach czerwonych piceid występuje również w formie izomeru *cis* (**Rys. 1.1.1.d**). W winogronach odmiany *Casteao* uprawianej w Portugalii zawartość w suchej skórcie *trans*- i *cis*-piceidu wynosiła odpowiednio 67,24 i 58,90 mg/kg, co stanowiło prawie trzykrotnie większą zawartość, niż TR. Bardzo bogatym źródłem *trans*-piceidu jest też sok winogronowy. Stężenie tego glikozydu w soku z czerwonych winogron jest około 20-krotnie wyższe, niż w soku z białych winogron [18]. Sok z ciemnych winogron zawiera średnio 3,38 mg/L TR, podczas gdy *cis*-piceidu jest ok. 0,18 mg/L [18]. Z dotychczasowych badań wynika, że najbogatszym źródłem TR jest korzeń rdestowca ostrokończystego (*Reynoutria japonica*). Oprócz TR i CR w korzeniu tej rośliny występuje *cis*- i *trans*-piceid oraz 4'-O-glikozyd TR. Badania Burnsa i wsp. [19] pokazały, że w naparze przygotowanym

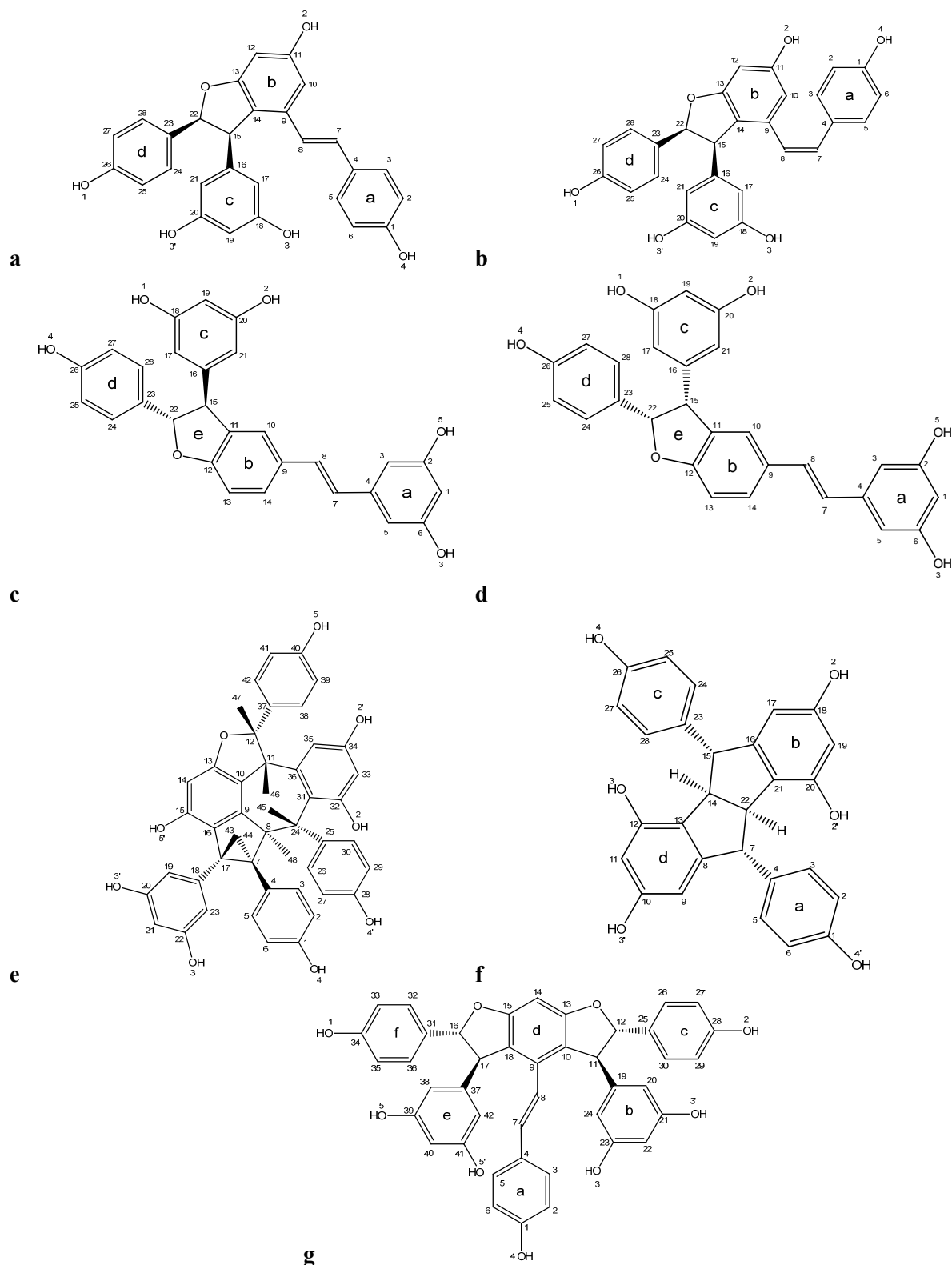
z tej rośliny znajduje się ok. 974 mg całkowitego resweratrolu w postaci aglikonu i glukozydu. Po raz pierwszy TR wyizolowano w 1939 roku z rośliny *Veratrum grandiflorum* [20]. W 1976 roku odkryto go w winie gronowym i owocach *Vitis vinifera* w trakcie badań nad odpornością rośliny na infekcję grzybową [21]. Późniejsze badania doprowadziły do oznaczenia stężenia TR w skórce winogron i różnych gatunkach win. Wykazano, że stężenie tego związku w winie jest w zakresie od 0,2 mg/L do 10,6 mg/L, przy czym dokładna wartość zależy od rodzaju winogron [20]. Praca Juan [23] pokazała, że w winach Merlot stężenie TR może osiągać nawet wartość 7,74 mg/L. W porównaniu z winem czerwonym, białe zawiera mniejsze stężenie TR i jego pochodnych. Przykład: suma stilbenoidów w próbkach z białych winogron wynosi średnio 0,49 mg/L, a w próbkach z czerwonych winogron 4,73 mg/L [23]. Przy umiarkowanym spożyciu wina (150-200 mL) dziennie możemy przyswoić 0,627-2,75 mg TR i jego pochodnych znajdujących się w czerwonych winach z Hiszpanii [24] lub około 3 mg tego związku wraz z winem pochodzącym z Portugalii [25].

Badania pokazały, że TR jest transportowany do żywych komórek w postaci łatwo rozpuszczalnego w wodzie 3-O-glukuronianu, który następnie w cytoplazmie komórkowej pod wpływem glukuronidazy ulega hydrolizie enzymatycznej do obojętnej formy TR oraz kwasu glukuronowego [26-28]. Uważa się, że formą posiadającą aktywność farmakologiczną jest wolny resweratrol, natomiast glukuroniany tego stilbenoidu uznaje się za nieaktywne, chociaż istnieją doniesienia o możliwym biologicznym działaniu takich połączeń. Aumont i wsp. [26] wykazali po raz pierwszy, że TR w komórkach wątrobowych u szczurów łatwo ulega biotransformacji do glukuronianu. W ich eksperymencie komórki z wątroby szczura zostały wprowadzone do roztworu zawierającego TR oraz kompleks 5'-difosforanu(V) urydyny i kwasu glukuronowego. Na podstawie wyników uzyskanych za pomocą wysokowydajnej chromatografii cieczowej (HPLC) wydzielono główny produkt metabolizmu. Widmo masowe potwierdziło, że metabolitem tym jest glukuronian TR, w którym reszta kwasu glukuronowego jest związana z atomem O3 [30]. Co więcej, badania przeprowadzone przez Meng i wsp. [27] wykazały, że w próbce osocza pobranego od szczura, któremu podano TR, 90% z całkowitej ilości tego związku występuje w postaci glukuronianu. TR jest również metabolizowany do siarczanów(VI) w komórkach na drodze sulfonowania. W wyniku tego procesu powstają siarkowe metabolity, m.in. sulfonian i siarczan(VI) TR, które wykazują bardzo dobrą rozpuszczalność w płynach ustrojowych. Badania Wenzel i wsp. [28] udowodniły, że obok glukuronianu, metabolity TR stanowią mono-, di- oraz trisiarczany(VI). Jednakże badania eksperymentalne wykazały, że glukuronacja dominuje nad sulfonowaniem w szlaku metabolicznym

TR. W **Tabeli 1.1.2.** przedstawiono podsumowanie najważniejszych farmakokinetycznych i farmakologicznych badań nad TR.

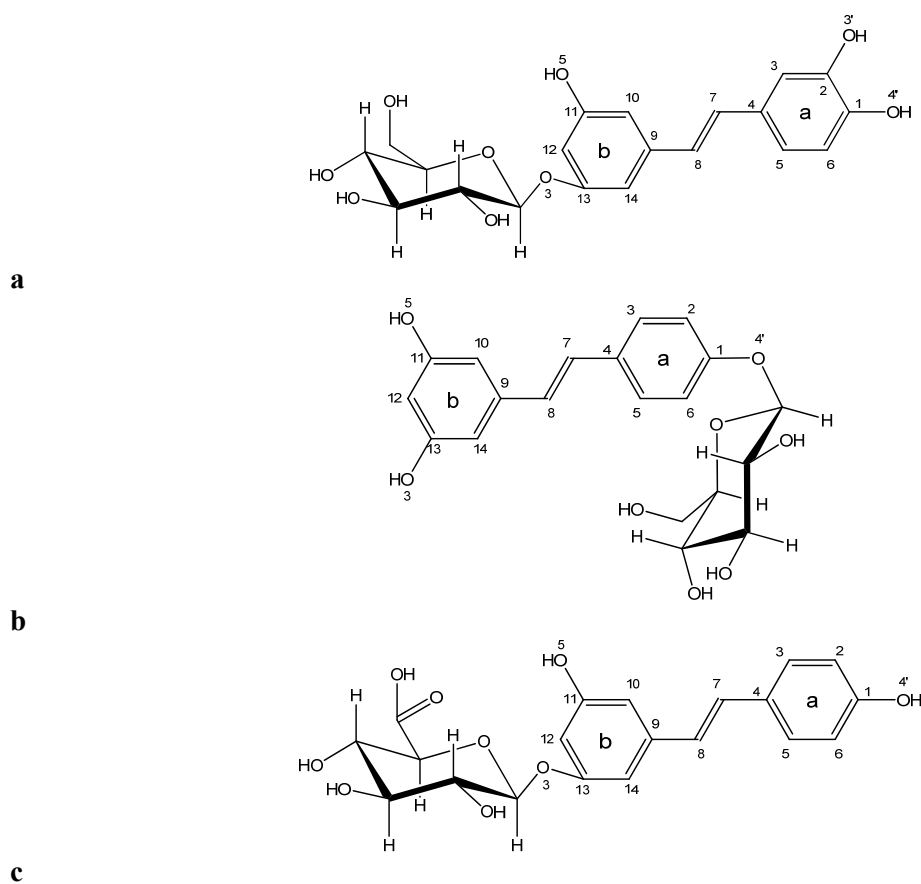
Pierwsze badania materiału biologicznego w kontekście przemian metabolicznych TR przeprowadzili Juan i wsp. [23]. Po podaniu szczurom izomeru *trans* (2 mg/kg), po 15 min. jego stężenie w osoczu wynosiło 0,175 mg/L. W innym badaniu, po podaniu szczurom tej samej ilości TR po 10 min. osiągał on stężenie maksymalne 550 ng/mL, a oznaczany był jeszcze 60 min. po podaniu. Absorpcję, biodostępność i metabolizm TR u ludzi badali Walle i wsp. [29], podając doustnie zdrowym ochotnikom znakowany ^{14}C -TR w dawce 25 mg. Po godzinie oznaczyli maksymalne stężenie tego polifenolu we krwi (491 ng/mL). Badanie mechanizmów wchłaniania w jelitach TR jest konieczne do sprawdzenia, czy związek ten może być użyty w farmakoterapii i farmakokinetyce. Podejmowano wiele prób w celu wyjaśnienia tego procesu [30,31]. Pionierskie badania zapoczątkowane przez Andlauer i wsp. [30] wykazały, że TR w kosmkach jelitowych ulega bardzo szybkiemu wchłanianiu i następnie biotransformacji do glukuronianu. Do ciekawych wyników doszli Henry i wsp. [31], badając wchłanianie TR przez ludzką rodzinę komórek Caco-2. Badania te udowodniły, że TR niezwykle łatwo ulega wchłonięciu przez szczytową część tej komórki i jest metabolizowany do pochodnej kwasu glukuronowego i siarkowego (VI). Natomiast do wnętrza komórki jest transportowany na zasadzie dyfuzji biernej. Stosując TR z podstawieniem izotopowym ^3H wykazano, że wątroba w organizmie człowieka jest głównym organem, w którym następuje praktycznie całkowita biotransformacja TR. Głównym metabolitem jest glukuronian, choć u szczurów oznaczono też monosiarczany oraz aglikon. Dwa stereoizomery resweratrolu inkubowane *in vitro* z ludzkimi mikrosomami wątrobowymi ulegały glukuronidacji do 3-O oraz 4'-O-glukuronianu resweratrolu [37]. Powstawanie tych koligatów jest katalizowane przez UDP-glukuronylotransferazę. Badanie mechanizmu glukuronidacji pokazało, że jest to proces wysoce stereoselektywny. Izomer *cis* resweratrolu jest metabolizowany znacznie szybciej (5-10 razy), niż jego izomer *trans*, a preferencja obu reakcji dotyczy głównie pozycji 3. Główną formą glukuronylotransferazy, która katalizuje glukuronidację izomeru *trans* jest UGT1A1, a izomeru *cis* – UGT1A6. Badania farmakokinetyczne miały na celu wyznaczenie stężenia TR w komórkach serca, wątroby i nerek. Otrzymane wyniki sugerują, że związek ten po szybkim wchłonięciu do krwi w jelicie cienkim ulega głównie akumulacji w komórkach wątrobowych i nerkowych. W badaniach tych wykorzystano parametr UAC – *Urinary Albumin Concentration*, jako miarę czasowego działania leku w środowisku komórkowym oraz osoczu. Największą wartość tego wskaźnika otrzymano dla osocza i płynu komórkowego tkanek pobranych z

nerkę i wątrobę. Uzyskane wyniki pokazują, że TR jest szybko wchłaniany i rozprowadzany w sercu, wątrobie i nerkach, a następnie sprawnie usuwany przez nerki i wraz z żółcią [32].



Rys. 1.1.2. Struktury oligomerów TR: a) *trans*-ε-winiferyna, b) *cis*-ε-winiferyna, c) *trans*-δ-winiferyna-A, d) *trans*-δ-winiferyna-B, e) α-winiferyna (suffruticosol B), f) pallidol, g) gnetina H

W winie stwierdzono też obecność w dużym stężeniu hydroksylowej pochodnej TR, a mianowicie PC. Ribeiro de Lima i wsp. [25] pokazali, że stężenie tego związku w winach francuskich jest blisko trzykrotnie większe od stężenia TR i wynosi ok. 13,1 mg/L. W winie zidentyfikowano też *trans*-astringinę (3- β -O-glukozyd PC, **Rys. 1.1.3.a**) oraz oligomery TR: δ -winiferynę, ϵ -winiferynę, pallidol oraz tetramer — hopeafenol [33]. Powstawanie stereoisomeru *cis* jest najprawdopodobniej spowodowane izomeryzacją TR, zachodzącą podczas dojrzewania wina. Szczegółowy rozkład stężeń *trans*- i CR oraz *trans*- i *cis*-piceidu w winach z Francji i Portugalii przedstawiono w **Tabeli 1.1.3**.



Rys. 1.1.3. β -O-glukozydy TR, PC i 3-O-glukuronian TR: a) *trans*-astringina, b) TR-4'- β -O-glukopiranozyd, c) 3-O-glukuronian TR

Z występowaniem TR w czerwonym winie jest bezpośrednio związany tzw. „*paradoks francuski*”, opisany po raz pierwszy w 1992 roku [34], w związku z kardioprotekcyjną aktywnością TR. *Paradoks francuski*, to anomalne zmniejszenie chorób serca i układu krążenia u osób, które regularnie piją czerwone wino, mimo codziennej diety dość bogatej w tłuszcze. Efekt ten przypisano obecności TR, PC i flawonoidów – składników czerwonego wina i ich aktywności antyoksydacyjnej. Paradoksalnym wydaje się być fakt, że pomimo jedzenia tłustych potraw i jednoczesnego spożywania czerwonego wina przez Francuzów, ich zachoro-

walność na arteriosklerozę jest bardzo mała. Skłania to do wysunięcia przypuszczenia, że czerwone wino daje Francuzom szczególną ochronę przed tą chorobą. Bertelli i wsp. [35] przeanalizowali, w jaki sposób zawartość TR w czerwonym winie wpływa na jego zdolność do zapobiegania powstawaniu wolnych rodników hydroksylowych. Badaniom poddano regionalne czerwone wino o dużej zawartości tego polifenolu oraz wino o jego mniejszej zawartości. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że to pierwsze charakteryzowało się znacznym działaniem antyoksydacyjnym. Wyniki te sugerują, że TR jest istotnym składnikiem aktywnym czerwonych win, hamującym powstawanie wolnych rodników, zwłaszcza hydroksylowych.

Oprócz czerwonego wina, innym źródłem TR są orzeszki ziemne. W warunkach naturalnych największe stężenie TR występuje w niedojrzałym bielmie nasion. Na podstawie badań przeprowadzonych przez Sanders i wsp. [36] należy wnioskować, że nieprzetworzone orzechy ziemne zawierają 0,02-1,79 µg/g TR. Pozbawione łupiny, gotowane orzechy charakteryzują się największą ilością tego związku (5,138 µg/g) [37]. Co więcej, Ibern-Gomez i wsp. [38] oznaczyli zawartość TR w maśle orzechowym na poziomie 0,27-0,75 µg/g. Ostatnio przeprowadzone badania Lyons i wsp. [39] pokazały, że innym źródłem TR w przyrodzie są borówki. Stwierdzono, że największa zawartość tego związku występuje w północnoamerykańskiej borówce wysokiej (0,006 ng/g świeżej masy) oraz borówce czernicy (0,003 ng/g świeżej masy). Badania Rimando i wsp. [40] wykazały, że nie tylko TR jest składnikiem borówek. Również pterostilben i PC są obecne w tych owocach na poziomie 138-422 ng/g. Mimo, że zawartość TR i jego pochodnych jest zdecydowanie mniejsza, niż w czerwonych winach, czy skórkach winogron, owoce borówki stanowią wartościowe źródło stilbenoidów. Stąd są one owocami o cennych właściwościach leczniczych.

PC, czyli *trans*-3,4,3',5'-tetrahydroksystilben, piceatannol lub astringenina (**Rys. 1.1.1.f**) jest oprócz TR jednym z najlepiej poznanych stilbenoidów występujących w przyrodzie. Jego główne źródła występowania to: trzcina cukrowa, czarne jagody, borówki, orzeszki ziemne, czerwone wina oraz skórka czerwonych winogron [41]. Po raz pierwszy został wyizolowany z rośliny *Euphorbia lagascea* [42] w 1984 roku. Roślina ta jest stosowana w medycynie ludowej jako lek na choroby nowotworowe oraz brodawki. PC jest syntezowany w roślinie w odpowiedzi na atak grzybów, działanie światła ultrafioletowego oraz infekcję bakteryjną [50]. Wzmoczoną syntezę PC zaobserwowano również podczas dojrzewania winogron oraz w trakcie fermentacji wina, zachodzącej pod wpływem β-glukozydazy, wytwarzanej przez bakterie aneorobowe [43]. PC został również wyizolowany z azjatyckiej rośliny strącz-

kowej *Cassia garrettiana*, pochodzącej z Azji [44]. Ostatnio przeprowadzone badania rzuciły światło na występowanie i mechanizm powstawania PC w żywych komórkach. Wykazano, że związek ten jest jednym z głównych metabolitów TR, powstających w cytochromie P450 przy współdziale enzymów 1A2 oraz 1B1. W jednym z badań, w których wykorzystano mikrosomy z komórek wątroby człowieka dowiedziono, że głównym metabolitem TR jest właśnie PC. Ponadto badania te pokazały, że szybkość tej biotransformacji jest bardzo duża, co potwierdzają jej parametry kinetyczne $K_m = 21 \mu\text{M}$ oraz $v_{\max} = 86 \text{ pmol}^{-1}\text{mg}^{-1}$ [45]. Potter i wsp. [46] badali mechanizm powyższej reakcji, wykorzystując w eksperymentach ludzkie limfocyty, wyposażone w cytochrom P450. Z badań wynika, że procesowi temu towarzyszy powstawanie dwóch kolejnych tetrahydroksylowych pochodnych *trans*-stilbeny. Wyniki tych prac eksperymentalnych prowadzą do wniosku, że TR może być potencjalnym lekiem, który działa jako substancja generująca inne stilbenoidy o właściwościach leczniczych.

Pinosylwina (*trans*-3',5'-dihydroksystilben) to jeden z najlepiej poznanych stilbenoidów, który ma zdolność ochrony przed różnymi infekcjami. Ten stilbenoid jest głównym składnikiem ekstraktów wydzielonych z różnych części sosny oraz eukaliptusa [47]. Największe stężenie pinosylwiny zostało zaobserwowane w igłach sosny w odpowiedzi na infekcje. Możemy stąd wnioskować, że pinosylwina jest substancją chroniącą kambium sosny przed szkodliwymi bakteriami, wirusami oraz grzybami. Kilka prac jednoznacznie pokazało, że pinosylwina chroni różne fragmenty sosny i drzew okrytonasiennych przed chorobami oraz procesami próchniczymi [48]. W szczególności wykazano, że stilbenoid ten jest efektywnym inhibitorem próchnicy w próbkach drewna wyodrębnionego z osiki i brzozy, w przeciwieństwie do TR, który w tym samym stężeniu, co pinosylwina wykazywał zdecydowanie słabsze działanie antypróchnicze.

Rapontygenina (*trans*-3,3',5-trihydroksy-4-metoksytilben) jest kolejnym stilbenoidem, który jest obecnie intensywnie badany pod kątem jego aktywności antyoksydacyjnej, antynowotworowej, antyalergiczej, przeciwzapalnej oraz jako substancja wspomagająca układ krążenia [49]. Głównym źródłem raportygeniny jest rabarbar, który był stosowany w medycynie chińskiej z uwagi na jego silne działanie przeczyszczające i przeciwzapalne. Silniejsze działanie lecznicze wykazuje glukozyd raportygeniny – raportycyna, która jest stosowana w leczeniu syndromu Oketsu, objawiającego się niewydolnością krążenia, dolegliwościami bólowymi oraz chronicznymi stanami zapalnymi [50]. Rapontygenina była również rekomendowana, jako potencjalny lek stosowany przeciwko alergiom [51].

W ostatnich latach obiektem intensywnych badań stał się pterostilben (*trans*-3,5-dimetoksy-4'-hydroksystilben) z uwagi na jego silną aktywność biologiczną. W szczególności, w kilku pracach, autorzy pokazali, że substancja ta posiada zdolność obniżania stężenia glukozy w surowicy oraz indukowania apoptozy komórek nowotworowych. Stilbenoid ten jest aktywnym składnikiem czarnej jagody, szyszek chmielu, rośliny *Botrytis vinifera* oraz niedojrzałych jagód odmiany *Pinot* i *Gamay* [40]. Rimando i wsp. [40] pokazali, że w jagodach rodzaju *Vaccinium*, pterostilben występuje w stężeniu wynoszącym 99-520 ng/g suchych owoców. Duże stężenie tego związku obserwowane jest w skórkach winogron odmiany *Xarello*, natomiast mała ilość pterostilbenu znajduje się w ekstrakcie z liści winogron. Należy podkreślić, że w porównaniu z innymi polifenolami związek ten nie występuje w czerwonym winie [52], stanowi natomiast główny polifenolowy składnik *darkchassavey* – tradycyjnego napoju spożywanego przez Hindusów w celu ochrony organizmu przed chorobami serca i innymi dolegliwościami [53]. Ponadto, związek ten znajduje się w drzewie *Pterocarpus marsupiu*, którego kambium stosowane jest jako naturalny lek przeciw cukrzycy. Warto przy tym zaznaczyć, że pterostilben został po raz pierwszy wyizolowany z tej rośliny. Również kora łożdgi *Guibourtia tessmani* zawiera ten związek i jest stosowana w afrykańskiej ludowej medycynie, jako lek na różne dolegliwości.

1.2. Właściwości przeciwutleniające, przeciwlipemiczne i kardioprotekcyjne TR oraz innych stilbenoidów

Reaktywne formy tlenu, to indywidualne chemiczne zawierające w swoim składzie atomy tlenu z niesparowanym elektronem i inne pochodne tlenu tripletowego, łatwiej wchodzące w reakcje, niż tlen cząsteczkowy. Reaktywne formy tlenu powstają jako naturalny produkt metaboliczny i odgrywają rolę sygnalizatorów komórkowych. Jednakże w czasie stresu oksydacyjnego ilość tych form może drastycznie wzrosnąć, powodując degradację organelli komórkowych. W takiej sytuacji następuje zwiększenie ekspresji genów kodujących enzymy – katalazy i dysmutazy nadadtlenkowej. Organizm człowieka dysponuje sprawnym systemem chroniącym komórki przed stresem antyoksydacyjnym. Składa się on głównie z przeciwutleniaczy endogennych, czyli enzymów: katalazy, peroksydazy oraz dysmutazy, spośród których największe znaczenie ma dysmutaza nadadtlenkowa oraz peroksydaza glutationowa. Bardzo ważną rolę w zmniejszaniu uszkodzeń komórkowych, wywołanych przez wolne rodniki, odgrywają przeciwutleniacze pochodzenia naturalnego. Należą do nich głównie związki polife-

nolowe, flawonoidy, witaminy C i E oraz karotenoidy. Badania potwierdzają silną aktywność przeciwutleniającą polifenoli zawartych w zielonej herbacie oraz w czerwonych winogronach.

W ostatnich latach szczególną uwagę zwrócono na TR. Badania te w sposób jednoznaczny udowodniły aktywność antyoksydacyjną tego związku na poziomie komórkowym w testach *in vivo* oraz *in vitro* [54,55]. Pokazano, że aktywność biologiczna jest zdeterminowana płaską budową szkieletu *trans*-stilbenowego obojętnego związku oraz jego form rodnikowych, a także obecnością grup hydroksylowych w pierścieniach aromatycznych. Co więcej – udowodniono, że obecność wiązania winylowego zapewnia efektywną delokalizację niesparowanego elektronu w rodnikach fenoksylovych. Efektem koniugacji między dwoma pierścieniami jest istnienie dużej ilości struktur rezonansowych, co przekłada się na zwiększenie trwałości rezonansowej rodników TR. Wykazano także, że grupa hydroksylowa zawarta w pozycji *para* ma decydujące znaczenie w zmiataniu wolnych rodników, gdyż wiązanie O-H w tej pozycji jest najmniej trwałe [56]. W efekcie jest ono bardzo podatne na homolityczny rozpad w interakcji z wolnymi rodnikami. Francuzi w porównaniu z innymi populacjami rzadziej zapadają na choroby sercowo-naczyniowe. Pozytywny wpływ TR na spadek tych chorób może być wynikiem dezaktywacji wolnych rodników, działania ochronnego wobec oksydacji cholesterolu LDL (*Low Density Lipoproteid*), a także modyfikacji przemian tłuszczowych. Wśród wielu procesów prowadzących do powstania miażdżycy istotną rolę odgrywa wspomniane utlenianie LDL oraz lipidów, stanowiących główny składnik błon białkowo-lipidowych. Szkodliwe rodniki na poziomie komórkowym indukują peroksydację tłuszczów, w wyniku czego powstają szkodliwe nadtlenki alkilowe kwasów tłuszczowych, które bezpośrednio uszkadzają śródbłonek małych naczyń krwionośnych, uruchamiając tym samym kaskadę reakcji prowadzących do powstawania zmian miażdżycowych.

W 1993 roku Frankel i wsp. [57] donieśli po raz pierwszy o właściwościach antyoksydacyjnych resweratrolu wobec peroksydacji LDL katalizowanej przez jony Cu(II). Ich badania dowiodły, że TR wykazuje zdolność do neutralizacji wolnych rodników generowanych w obecności jonów Cu(II) oraz ich chelatowania. Ta ostatnia właściwość dla izomeru *cis* resweratrolu wynosi około połowy aktywności izomeru *trans*, podczas gdy oba stereoizomery są podobnie skuteczne, jako zmiatacze wolnych rodników w systemach biologicznych. Wykazano również, że związek ten działa na etapie inicjacji i progresji procesu peroksydacji mikrosomalnej silnie zależnej od obecności jonów Fe(III). W przeciwieństwie do poprzednich badań, w tym przypadku wykazano, że TR nie ma zdolności do chelatowania jonów Fe(III). Również Miura i wsp. [58] udowodnili, że TR hamuje peroksydację lipidów katalizowaną

przez jony Fe(III), co sugeruje jednocześnie działanie anty- i prooksydacyjne. Formy jonowe żelaza biorą udział w reakcjach transferu elektronu, co powoduje, że ten metal jest grupą prostetyczną enzymów katalizujących reakcje redoks, w wyniku których mogą tworzyć się wolne rodniki. Frémont i wsp. [59] wykazali, że związek ten efektywnie zapobiegał oksydacji lipidów wywołanej jonami metali w mikrosomach oraz lipoprotein występujących w LDL. W pracy tej badano również wpływ obecności witaminy C na aktywność antyoksydacyjną TR. Okazało się, że kombinacja tych dwóch substancji jest bardziej skuteczna w ochronie komórek, niż każdy z przeciwutleniaczy osobno. Antyoksydacyjna aktywność TR ujawnia się także w procesie rozpadu DNA, indukowanego przez ten polifenol i jony Cu(II). Fukuhara i Miyata [60] po raz pierwszy pokazali, że TR wiąże się z DNA oraz, że rozpad DNA jest uwarunkowany obecnością jonów Cu(II), tlenu i obojętnym pH. Natomiast w warunkach beztlenowych, nawet zwiększenie stężenia TR nie miało wpływu na szybkość rozpadu DNA. Późniejsze badania Fukuhary i wsp. [61] wykazały, że w obecności TR i jonów Cu(II) generowane są rodniki hydroksylowe, które uczestniczą w procesie degradacji DNA. Ponadto stwierdzono, że TR wykazuje zdolność do tworzenia trwałych kompleksów z tymi jonami. Kompleksy te z kolei mogą uczestniczyć w procesie generowania innych wolnych rodników. Wykazano także, że TR w roztworze zawierającym kwas askorbowy i glutation nie wykazuje zdolności do zwiększania stężenia rodnika hydroksylowego, który jest generowany przez połączenia TR z jonami Cu(II). Ostatnie badania wykazały, że stilbenoid ten w stężeniu 10 μM znacząco stymuluje rozpad nici DNA indukowany przez układ 5'-difosforan(V) adenozyiny- Fe^{3+} w obecności nadtlenu wodoru. Znaczący wkład w zrozumienie aktywności antyoksydacyjnej TR wniosły badania Zini i wsp. [62]. Sugerują oni, że istnieją trzy różne mechanizmy antyoksydacyjne dla tego związku:

1. Kompetencyjny mechanizm z koenzymem Q, prowadzący do zmniejszania liczby procesów biochemicznych, generujących reaktywne formy tlenu.
2. Mechanizm prowadzący do neutralizacji anionorodnika ponadtlenkowego, powstającego głównie w mitochondriach.
3. Mechanizm inhibicji peroksydacji lipidów, indukowanej przez reakcję Fentona.

Do zrozumienia aktywności antyoksydacyjnej TR i jego hydroksylowych pochodnych przyczyniła się praca Shang i wsp. [63]. Autorzy badali mechanizmy i kinetykę reakcji TR z glawinoksylowym oraz 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazydowym rodnikiem w roztworze etanolem oraz w octanie etylu. Badania pokazały, że mechanizm reakcji zależy od środowiska reakcyjnego, a także budowy badanego polifenolu. Wykazano, że obecność dodatkowej grupy

hydroksylowej w pierścieniu aromatycznym zwiększa zdolności antyoksydacyjne badanego związku. Stwierdzono, że w etanolu dominuje mechanizm oparty na przeniesieniu wodoru z polifenolu na rodnik. Według tego mechanizmu i mechanizmu opartego na protonowej dysocjacji w układach biologicznych zachodzi proces wymiatania rodników przez polifenol. W pracy tej również wyznaczono za pomocą metod spektroskopowych geometrię dimeru, powstałego w wyniku oksydacyjnej dimeryzacji rodników TR.

Duży wkład w poznanie aktywności przeciwutleniającej wnieśli Wang i wsp. [64]. Używając metody Rancimata, która bazuje na reakcji polifenolu z rodnikiem DPPH zbadano zdolność do wymiatania tego rodnika przez następujące polifenole: 3,4',5-trihydroksystilben, 3,3',4,5'-tetrahydroksystilben, 3,4,4',5'-tetrahydroksystilben, 3,3',5,5'-tetrahydroksystilben oraz 3,3',4,5,5'-pentahydroksystilben. Na podstawie wyznaczonych eksperymentalnie wartości parametrów antyoksydacyjnych stwierdzono, że wszystkie te polifenole są silniejszymi antyoksydantami, niż TR. Badania wykazały także, że rodniki TR ulegają spontanicznej dimeryzacji. Po wyizolowaniu dimeru z roztworu, za pomocą widma ^1H oraz ^{13}C NMR ustalono jego budowę. Antyoksydacyjny efekt TR i jego pochodnych na peroksydację kwasów tłuszczowych w roztworze siarczanu(VI) dodecyłu był również badany przez Fang i wsp. [65]. W pracy tej wykazano, że aktywność antyoksydacyjna badanych związków zależy od lokalizacji grup hydroksylowych w pierścieniu aromatycznym, potencjału oksydacyjnego oraz środowiska reakcji. W szczególności wykazano, że obecność grup hydroksylowych w położeniu *orto* i *para* wyraźnie zwiększa moc antyoksydacyjną badanych związków. Zdolność do wymiatania anionorodnika nadadtlenkowego przez TR i jego hydroksylowe pochodne oraz relacja pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną, a strukturą była badana przez Muriasa i wsp. [66]. Otrzymane wyniki zaprezentowane w tej pracy pokazują, że wszystkie badane pochodne TR są od niego znacznie silniejszymi przeciwutleniaczami. Jak wiadomo, regulacja stężenia tlenku azotu(II) (NO) odgrywa istotną rolę w kardio- i neuroprotekcji. Badania dowodzą, że bardzo duże stężenie NO w komórkach jest bezpośrednio związane z szybkim wzrostem guzów nowotworowych oraz stopniową degradacją naczyń krwionośnych pod wpływem wysokiego ciśnienia krwi. Aktywność NO w komórkach żywych była przedmiotem wielu badań. Dużo uwagi poświęcono wpływowi TR na regulację tempa powstawania NO w śródbłonku naczyń włosowatych [67,68]. Między innymi Lorenz i wsp. [67] badali wpływ TR na stężenie NO podczas stresu antyoksydacyjnego. Ich badania pokazały, że TR wyraźnie zmniejsza produkcję NO i jest bezpośrednim inhibitorem enzymów uczestniczących w szlakach biochemicznych, prowadzących do powstawania tego gazu. Ponadto, na podstawie ba-

dań Hsieh i wsp. [68] stwierdzono, że TR indukuje syntazę tlenku azotu (iNOS) w śródbłonku tętnic.

W ostatnich latach zwrócono również uwagę na aktywność antyoksydacyjną CR [6,69]. Po raz pierwszy takie badania zostały wykonane przez Leiro i wsp. [69]. W pracy tej badano wpływ CR na stężenie reaktywnych form tlenu i azotu, a także procesy syntezy prostaglandyn, jako mediatorów stanu zapalnego. Autorzy wykazali wpływ stężenia CR na aktywność oksydazy ksantynowej oraz cyklooksygenazy. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że CR w zakresie stężeń 1-100 μM efektywnie hamuje produkcję reaktywnych form tlenu w procesach komórkowych, natomiast w zakresie stężeń 10-100 μM zmniejsza tempo generowania reaktywnych form azotu. Z kolei w zakresie stężeń 1-100 μM CR okazał się być nieefektywnym zmiataczem anionorodnika nadadtlenkowego, który jest generowany w procesach enzymatycznych, realizowanych przez kompleks oksydazy ksantynowej. Badania pokazały również, że CR zmniejsza aktywność oksydazy $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$ w komórkach makrofagów myszy oraz hamuje syntezę podjednostek wchodzących w skład syntazy NO i cyklooksygenazy COX-2. Finalnie, autorzy stwierdzili, że polifenol ten może być potencjalną substancją przeciwzapalną, gdyż hamuje syntezę prostaglandyn. Z właściwościami antyoksydacyjnymi jest ściśle związana aktywność antyagregacyjna TR, która ma istotne znaczenie w kardioprotekcji. Badania wykazały, że związek ten ma zdolność do dezaktywacji wolnych rodników w płytkach krwi oraz inhibicji aktywności cyklooksygenazy COX-2, co prowadzi między innymi do zahamowania syntezy tromboksanu A_2 , odpowiedzialnego za agregację płytek krwi. Prace eksperymentalne Fragopoulou i wsp. [70] wniosły duży wkład w zrozumienie antyagregacyjnej aktywności TR. Badacze ci dowiedli, że zahamowanie czynnika aktywującego płytki krwi jest jedną ze składowych antyagregacyjnego działania TR. W badaniu hamowania agregacji króliczych płytek, indukowanych czynnikiem aktywującym wykazano, że TR działa jako efektywny inhibitor tego czynnika. Podobna siła działania charakteryzowała jego mono- i diacetylowe pochodne. Spośród wszystkich stilbenoidów wyizolowanych z korzeni *Reynoutria japonica*, TR już w stężeniu 10^{-6} mol/L hamował tworzenie produktów działania lipooksygenazy [59] i tromboksanu TxB_2 w leukocytach wielojądrowych, pochodzących z otrzewnej szczura. Warto nadmienić, że lipooksygenaza jest jednym z enzymów, katalizujących syntezę kwasu α -hydroksyperoksyseikozanotetraenowego poprzez produkt pośredni – kwas hydroksyseikozanotetraenowy. Bierze ona udział w metabolizmie kwasu arachidonowego, który prowadzi do syntezy leukotrienów, będących mediatorami stanu zapalnego.

Ta właściwość lipooksygenazy dowodzi, że inhibicja tego enzymu przez TR tłumaczy jego przeciwzapalną aktywność.

TR ma działanie kardioprotekcyjne, zapobiega chorobie niedokrwiennej, nasila relaksację mięśni gładkich, naczyń krwionośnych i ma właściwości ochronne w stosunku do śródbłónka naczyniowego. Badania Buryanovskyy i wsp. [71] wykazały, że działanie to może mieć związek z hamowaniem reduktazy chinonowej, co powoduje zwiększenie aktywności komórkowych enzymów antyoksydacyjnych i zwiększenie odporności komórek na stres oksydacyjny. Cao i wsp. [72] wykazali, że poddanie kardiomiocytów wstępnemu działaniu TR, poprzedzającemu narażenie na stres oksydacyjny powoduje wzrost aktywności enzymów zapobiegających powstawaniu wolnych rodników i nasilenie syntezy NO. Wyniki Kaneidera i wsp. [73] pokazały, że jedną z przyczyn kardioprotekcyjnego działania TR jest jego wpływ na proces agregacji płytek krwi, metabolizm nukleotydów adenozynowych w śródbłónku naczyniowym oraz na metabolizm trombiny. Aktywność przeciwmiażdżycowa TR została potwierdzona w eksperymentach Fukao i wsp. [74]. W badaniach tych wykorzystano myszy z predyspozycją do miażdżycy, brakiem apolipoproteiny E i receptora LDL oraz z uszkodzonym śródbłónkiem naczyniowym. Zwierzęta otrzymywały pokarm z dużą zawartością tłuszczów i TR w dawce 9,6 lub 96 mg/kg przez 8 tygodni. Dynamika rozwoju zmian miażdżycowych była obserwowana w aorcie, a powstawanie zakrzepów indukowano w tętnicy szyjnej. Stwierdzono, że stężenie całkowitego cholesterolu i triglicerydów we krwi zmniejszyło się o około 30% w grupie szczurów przyjmujących resweratrol. Zaobserwowano szczególnie duże zmniejszenie zmian miażdżycowych w aorcie oraz tętnicy szyjnej. Silne działanie kardioprotekcyjne wykazuje też PC, co potwierdziły badania Hung i wsp. [75]. W pracy tej wyjaśniono mechanizm działania ochronnego tego stilbenoidu na tkanki mięśnia sercowego podczas ich niedotlenienia. Ponieważ niedokrwienie tego mięśnia jest głównie spowodowane stresem oksydacyjnym, autorzy stwierdzili, że PC jako silny antyoksydant wykazuje działanie ochronne. Ponadto wykazano, że PC w znaczący sposób zmniejsza tachykardię sercową oraz śmiertelność spowodowaną zawałem serca. Natomiast badania biochemiczne ujawniły, że polifenol ten zmniejsza stężenie dehydrogenazy mleczanowej oraz zwiększa poziom NO we krwi u pacjentów ze świeżym zawałem serca, którym podawano przez 4 godziny PC w pożywieniu. Ciekawych i obiecujących wyników dostarczyły eksperymenty Seidmana i wsp. [76], którzy testowali wpływ resweratrolu na ochronę słuchu przed szkodliwym działaniem stresu oksydacyjnego generowanego hałasem [205]. Przebadano szczury, które podzielono na dwie grupy: pierwsza otrzymywała do picia roztwór 430 µg resweratrolu na dobę przez siedem dni;

druga grupa otrzymywała natomiast wodę. Szczurom z obu grup wykonano pomiary słuchowych potencjałów wywołanych dźwiękiem o częstotliwościach 3, 6, 9, 12 oraz 18 Hz, a po 21 dniach zwierzęta poddawano 24-godzinnemu działaniu hałasu o natężeniu 105 dB i częstotliwości w zakresie 4500-9000 Hz [205]. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że u szczurów, które otrzymywały resweratrol zaburzenia słyszenia były mniejsze niż w grupie kontrolnej. Autorzy wnioskowali, że TR może zapobiegać utracie słuchu w wyniku stresu oksydacyjnego, udaru mózgu lub urazów mechanicznych.

Ostatnie badania dowodzą, że PC posiada silniejsze właściwości antyoksydacyjne niż TR. Wielu badaczy uważa, że może to mieć związek z obecnością dodatkowej grupy hydroksylowej i płaską strukturą szkieletu *trans*-stilbenowego. Podobnie jak TR, PC jest potencjalnym inhibitorem peroksydacji lipidów indukowanej jonami Cu(II) [77]. Ponadto w pracy tej pokazano, że PC jest aktywnym antyoksydantem, który zmiata rodnik DPPH (rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowy). Późniejsze badania dowiodły, że PC jest efektywnym wymiataczem rodników nadtlenkowych, co może mieć znaczenie w ochronie układu krwionośnego przed szkodliwym działaniem. Praca Lee i wsp. [78] pokazała, że TR oraz PC zwiększają szybkość gojenia się ran, co może być związane z regulacją stężenia katalazy w ranie przez te substancje. Ostatnie badania dowodzą, że PC jest bardziej efektywnym inhibitorem generowania tlenu azotu oraz nadtlenku wodoru, niż TR. Ostatnio pokazano, że PC przejawia wysoce selektywną cytotoksyczność względem komórek neuroglejowych, które wytwarzają duże ilości NO [67]. W pracy tej badano też wpływ PC oraz TR na inhibicję syntazy tlenu azotu i stwierdzono, że oba stilbenoidy wywierają mały wpływ na aktywność tego kompleksu enzymatycznego. Należy również podkreślić, że PC, TR oraz rapontygenina mają zdolność do inhibicji procesu aktywacji jądrowego czynnika κ -B i tym samym wykazują zdolność do zmniejszania tempa podziału komórek nowotworowych.

Porównywalną aktywność przeciwutleniającą z TR posiada pterostilben, co zostało udowodnione w badaniach *in vitro*. Badania przeprowadzone przez Amorati i wsp. [79] ujawniły, że związek ten działa jako umiarkowany antyoksydant podczas interakcji z rodnikami nadtlenkowym. Pokazano też, że stereoizomer *cis* pterostibenu jest zdecydowanie słabszym antyoksydantem niż stereoizomer *trans*. Natomiast badania przeprowadzone przez Manickam i wsp. [80] ujawniły, że pterostilben jest bardzo efektywnym zmiataczem rodnika DPPH. Wykazano również, że pterostilben chroni lipidy przed peroksydacją, znacząco zmniejszając szybkość powstawania bardzo reaktywnego kwasu tiobarbiturowego, który wytwarzają komórki fibroblastów [81].

We wczesnych latach 80-tych badacze japońscy [82] donieśli o wpływie stilbenowych składników rośliny *Polygonum cuspidatum* na metabolizm lipidów. Wykazali, że TR hamuje odkładanie triglicerydów i cholesterolu w wątrobie szczurów karmionych mieszaniną oleju kukurydzianego, cholesterolu oraz kwasu cholowego. Natomiast *trans*-piceid zmniejsza poziom triglicerydów i frakcji LDL cholesterolu w osoczu, a także obniża stosunek całkowitego cholesterolu do jego frakcji HDL. Po doustnym oraz dootrzewnowym podaniu resweratrolu lub piceidu zmniejszona została także synteza endogennych triglicerydów w wątrobie szczura oraz myszy. W przeciwieństwie do tych badań, praca Turrens i wsp. [83] nie potwierdza antylipemicznego działania TR. Stwierdzili oni, że TR podany szczurom dootrzewnowo nie wpływał zasadniczo na profil lipidów, ani nie zapobiegał ich oksydacji *in vivo*.

1.3. Aktywność antynowotworowa TR i jego pochodnych

Badania ostatnich lat wniosły ogromny wkład w poznanie mechanizmów chemoprewencyjnego działania TR oraz jego pochodnych. Stwierdzono, że przez wpływ TR na ekspresję genów, pośrednio lub bezpośrednio związanych z hamowaniem wzrostu komórek i przyspieszaniem ich śmierci, polifenol ten może być silnym czynnikiem antynowotworowym, którego skuteczność zależy od dawki. Dane zawarte w **Tabeli 1.5.1.** przedstawiają przegląd najważniejszych badań nad antynowotworową aktywnością TR. W 1997 Jang i wsp. [84] pokazali, że TR działa na wszystkich etapach kancerogenezy: inicjacji, promocji oraz progresji nowotworu. Wyniki dotychczasowych eksperymentów wykazują skomplikowane i różnorodne mechanizmy. Działanie chemoprewencyjne wiąże się z zahamowaniem wielu czynników kancerogenezy, w tym czynników transkrypcyjnych NF- κ B, AP-1 oraz z modulowaniem aktywności cyklooksygenaz, lipooksygenaz, syntazy NO, inhibicją cytochromu P450, kinaz proteinowych – w tym kinazy tyrozynowej i kinazy białkowej C. Regulowanie aktywności białek TNF, białek FAS oraz cyklin A, B1 przez TR umożliwia wejście komórki nowotworowej na szlak apoptozy. Etap pierwszy procesu nowotworzenia stanowi inicjacja, podczas której czynniki kancerogenne oddziałując z DNA powodują zaburzenia w ekspresji materiału genetycznego. Na tym etapie najistotniejsza jest aktywność antyoksydacyjna, antymutagenna oraz indukcja przemian metabolicznych II fazy ksenobiotyków. Badania wykazały, że TR jako efektywny zmiatacz reaktywnych form tlenu zapobiega procesom nowotworzenia indukowanego przez te formy. Przykładowo – w zależności od stężenia – hamuje on generowanie wolnych rodników w ludzkich komórkach białaczki promielocytowej HL-60 po zadziałaniu na komórkę octanem tetradekanoforbolu [84]. Kolejnym etapem działania TR na etapie

kancerogenezy jest aktywność antymutagenna, przejawiająca się w inhibicji reduktazy chininowej – enzymu odpowiedzialnego za detoksyfikację kancerogenów. TR działa także jako antymutagen szczepu TM677 poddanego działaniu 7,12-dimetylobenzo[a]antracenu [84]. Zahamowanie enzymów fazy I metabolizmu zmniejsza ilość aktywowanych kancerogenów, z kolei indukcja enzymów II fazy wiąże się z szybszą i łatwiejszą eliminacją ich z organizmu. Na etapie promocji komórki z zainicjowanym procesem nowotworowym, przechodzą kolejne mutacje, a cechy zmienionych komórek zostają utrwalone. Tu istotne jest hamowanie czynników, stymulujących wzrost komórek nowotworowych. Ten związek również hamuje aktywność cyklooksygenazy COX-2 oraz funkcję hydroperoksydazy prostaglandynowej, co wpływa hamująco na kaskadę reakcji prowadzących do syntezy prostaglandyn, stymulujących rozwój guza nowotworowego. Według Szewczuka i wsp. [85] TR jest również selektywnym inhibitorem cyklooksygenazy COX-1. TR hamuje aktywację NF- κ B oraz AP-1, czyli czynników transkrypcyjnych, zaangażowanych w regulację genów ważnych dla wielu procesów zachodzących na poziomie komórkowym (w tym procesów apoptozy, proliferacji i różnicowania komórek). Ostatnim etapem rozwoju guza nowotworowego jest progresja – następuje wtedy wzrost komórek nowotworowych i ich ekspansja przez naciekanie miejscowych tkanek i przerzuty do odległych organów. Badania wykazały [84], że TR na tym etapie stymuluje różnicowanie komórek nowotworowych w ostrej białaczce promielocytowej.

Aktywność chemoprewencyjna TR została potwierdzona w wielu badaniach [84-88]. Związek ten hamował proces nowotworzenia w modelu raka gruczołu sutkowego i skóry u myszy, po ekspozycji na octan tetradekanoforbolu (TPA), poprzez inhibicję kinazy białkowej, której izoenzymy aktywowane są przez ten ester [86]. Zaobserwowano indukcję apoptozy wywołaną przez TR w różnych liniach komórkowych, m.in. komórkach skóry JB6, ludzkich promielocytów białaczki HL-60, różnych liniach raka sutka i raka prostaty [87]. W komórkach JB6 TR hamował aktywację guza indukowaną czynnikiem aktywującym TPA lub czynnikiem wzrostu naskórka (EGF), zależnie od dawki w zakresie 2,3-40 μ M. W liniach komórkowych raka sutka (KPL-1, MCF-7, MKL-F oraz T47-D) TR w zakresie stężeń 1 pM-180 μ M jest efektywnym inhibitorem wzrostu guza nowotworowego. Ponadto, ten sam związek w zakresie stężeń 1 pM-1 μ M spowalnia wzrost guza nowotworowego prostaty w liniach komórkowych PC3 oraz DU145. Natomiast w komórkach raka prostaty LNCaP TR jest inhibitorem wzrostu guza nowotworowego w obecności androgenów. Z kolei oligomer TR-vaticanol C wyizolowany z kory *Vatica rassak* wywołuje na drodze apoptozy śmierć dwóch linii komórek raka okrężnicy SW480 oraz białaczki HL-60 w stężeniu 4-7 razy niższym niż

TR [88]. Fulda i wsp. [89] pokazali, że TR jest związkiem indukującym podatność komórek na działanie chemioterapeutyków, stosowanych w leczeniu onkologicznym, np. w leczeniu raka płuc. Początkowe leczenie TR – powoduje, według autorów – hamowanie cyklu komórkowego w fazie S, co przyspiesza programowaną śmierć komórki na drodze apoptozy wywołanej przez stosowane leki [205]. Założenia te potwierdzają także badania Fuggetta i wsp. [90]. Obejmowały one izolację trzech linii komórek czerniaka złośliwego o różnym stopniu oporności na chemioterapeutyki. Poddano je działaniu tego związku – stwierdzono znaczące zahamowanie wzrostu komórek rakowych i zaburzenia cyklu komórkowego, powodujące uwrażliwienie na standardowe leczenie [205]. Na tej podstawie założono, że resweratrol może być jednym z leków stosowanych w zaawansowanych przypadkach czerniaka złośliwego. Baatout i wsp. [91] wykazali, że TR zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na działanie chemioterapeutyków, a działając w dużych dawkach, uwrażliwia komórki raka szyjki macicy, przewlekłej białaczki szpikowej i szpiczaka *myeloma multiforme* na promieniowanie X [205]. Ciekawych wyników badań nad aktywnością antynowotworową TR dostarcza praca Lu i Serrero [92]. W pracy tej badano wpływ TR na wzrost komórek raka piersi. Szczegółowe wyniki badań dowodzą, że związek ten hamuje wzrost linii komórkowych MCF-7 w zależności od dawki. W szczególności wykazano, że przeciwdziała on wzrostowi guza, który jest promowany przez 17- β -estradiol (E_2). W związku z tym pokazano, że TR wykazuje efekt antyestrogenowy już z przy stężeniu 10^{-6} M. Autorzy donieśli, że resweratrol zapobiega stymulacji ekspresji genu receptora progesteronu, indukowanej przez E_2 w komórkach nowotworowych. Finalnie autorzy stwierdzili, że działa jako częściowy agonista wobec receptora estrogenowego i jako jego antagonist w obecności estrogenu, co w efekcie prowadzi do hamowania wzrostu ludzkich komórek raka piersi. TR jako fitoestrogen reguluje ekspresję licznych genów związanych z rozwojem raka piersi, np. genu supresorowego BRCA1. Według Laux i wsp. [93] polifenol ten indukuje apoptozę komórek raka piersi przez działanie z białkiem p-53 [205]. Spośród nielicznych doniesień na temat skuteczności przeciwnowotworowej resweratrolu na uwagę zwraca doniesienie Liontas i Yeger [94,205]. Wyniki ich badań dotyczą nerwiaka niedojrzałego (*neuroblastoma*) – agresywnego nowotworu, który w zaawansowanych stadiach ma złe rokowania. Bruno i wsp. [95] potwierdzili, że TR ma wpływ na leczenie chłoniaka komórkowego. Badania wykazały też, że TR chroni komórki nabłonka oddechowego przed toksycznym i kancerogennym działaniem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, a mechanizm działania jest związany z wpływem tego związku na aktywność cytochromu P450. Badając antynowotworowe właściwości resweratrolu w stosunku do komór-

rek raka jajnika, Opipari i wsp. [96,205] pokazali, że zmiany biochemiczne i morfologiczne zachodzące w komórkach sugerują zachodzący w nich proces autofagocytozy, a nie apoptozy. Proces ten może być drugim, niezależnym od apoptozy, mechanizmem śmierci komórkowej, indukowanej przez resweratrol. Interesujące są wyniki eksperymentów Reagan-Shaw i wsp. [97], w których wykazano, że resweratrol stosowany w postaci kremów na skórę, u myszy zapobiega powstawaniu nowotworu skóry pod wpływem silnej jej ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe. Badacze stwierdzili, że u podstaw tego procesu leży najprawdopodobniej oddziaływanie TR z cyklinami, kinazą MAPK oraz inhibitorem kinaz-WAF1/p21.

Oprócz TR, silne działanie chemoprewencyjne wykazuje również pterostilben, co zostało potwierdzone eksperymentalnie w pracy Ferriera i wsp. [98]. Aktywność tę wykazano zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. W badaniach *in vitro* używając linii komórek czerniaka B16 pokazano, że ten polifenol w około 40% hamuje wzrost guza nowotworowego przy stężeniu pterostilbenu wynoszącym 40 μ M [98]. Ponadto stwierdzono, że dodanie do tego układu kwercetyny wyraźnie zwiększa inhibicję wzrostu guza nowotworowego [98]. Wniosek – pterostilben oraz kwercetyna wspólnie wpływają hamująco na szybkość podziału komórek. W badaniach *in vitro* nad adhezją komórek nowotworowych do komórek śródbłónki wyizolowanego z ludzkiej wątroby wykazano, że pterostilben zmniejsza szybkość adhezji w 60%, w porównaniu z TR, który był inhibitorem tej adhezji tylko w 47% [98]. Ponadto, w pracy tej egzaminowano wpływ podanego dożylnie myszom pterostilbenu na wzrost czerniaka w wątrobie. Ten etap badań wykazał, że pterostilben hamował w około 34% wzrost guza nowotworowego. Pterostilben był również badany pod kątem zdolności do indukowania apoptozy w komórkach leukocytów podczas białaczki złośliwej. Badanie linii komórkowej HL-60 pokazało, że polifenol ten jest bardziej aktywny w procesie apoptozy niż TR. Podobnie badania Roberti i wsp. [99] wykazały, że, w ogólności, pterostilben jest silniejszym inhibitorem rozwoju guza nowotworowego niż TR, natomiast stereoizomer *cis* pterostilbenu okazał się znacznie słabszym inhibitorem tego procesu, niż *trans*. W kolejnych badaniach [100] udowodniono, że pterostilben jest potencjalną substancją stymulującą apoptozę w liniach leukocytów, które zostały wzbogacone w onkogen Bcr-Ab oraz linii komórkowych, zawierających odporne fenotypy. Również w tej pracy wykazano, że pterostilben jest bardzo aktywny jako substancja apoptotyczna w liniach komórek białych ciałek krwi, zawierających zmutowany gen HUT78B oraz opornych na apoptozę w obecności TR oraz PC. Ostatnio zostały podjęte wstępne badania w celu zbadania wpływu pterostilbenu na inhibicję cyklooksygenaz, co ma kluczowe znaczenie w hamowaniu procesów prowadzących do rozwoju guza nowotworowe-

go [101]. W przeciwieństwie do TR, polifenol ten jest umiarkowanym inhibitorem cyklooksygenazy COX-1 oraz słabym inhibitorem cyklooksygenazy COX-2 [101]. Pterostilben działa cytotoksycznie wobec wielu linii komórkowych, jednak największą aktywność wykazuje wobec komórek raka piersi BC-1. Ponadto hamuje zmiany przednowotworowe, wywołane ekspozycją na dimetylobenzo[a]antracen w komórkach mysiego sutka i indukuje apoptozę w komórkach chłoniaka BJAB.

W ostatnim czasie kilka prac poświęcono antynowotworowej aktywności PC [102-105]. Wykazano, że związek ten jest efektywnym stymulatorem procesu apoptozy w ludzkich komórkach raka prostaty [102]. Dowiedziono również, że polifenol ten jest substancją antynowotworową wobec komórek raka płuc u myszy. Wydłuża również czas życia myszy z zawan-sowaną chorobą nowotworową. W pracy tej pokazano, że PC zarówno hamuje rozwój guza, jak i tworzenie się przerzutów [103]. Autorzy sugerowali także, że antynowotworowa aktywność PC może być związana ze zdolnością tego związku do hamowania powstawania komórek śródbłonna, występującego w żyłach pępka. Stwierdzono, że stężenie PC niezbędne do wywołania tej inhibicji wynosi 10 μ M. Badania Wieder i wsp. [104] pokazały, że TR oraz PC indukują apoptozę komórek chłoniaka, natomiast na podstawie pracy Roupe i wsp. [105] można wnioskować, że PC jest najbardziej aktywny wobec kolonii komórek nowotworowych HL60 oraz HCT-116. Ostatnio wykazano również, że polifenol ten zmniejsza szybkość proliferacji komórek ludzkiego gruczolaka. Badania wykazały, że PC już przy stężeniu wynoszącym 0,2 μ M wykazuje silne właściwości antynowotworowe. Ponadto stwierdzono, że polifenol ten ma wpływ na podział komórek. Dokładne badania pokazały, że PC zatrzymuje podział komórki w fazie S cyklu komórkowego. W efekcie obecność PC w komórkach guza nowotworowego powoduje zahamowanie tempa jego wzrostu.

Silne właściwości antynowotworowe wykazuje również rapontygenina [106,107]. Wkład do zrozumienia tej właściwości dostarczyła praca Chun i wsp. [106]. Pokazano w niej, że rapontygenina jest inhibitorem jednego z enzymów ludzkiego cytochromu P450 – enzymu 1A1. Jest on odpowiedzialny głównie za biotransformację wielu rakotwórczych związków. Spośród siedmiu badanych związków rapontygenina wykazywała najsilniejsze działanie inhibitorowe, a realizowana przez nią inhibicja jest kompetycyjna. Ponadto wykazano, że stilbenoid ten jest selektywnym inhibitorem aktywności enzymów CYP1A1 oraz CYP1A2. Ich zdolność do inhibicji skłoniły badaczy do stwierdzenia, że rapontygenina może być potencjalnym lekiem antynowotworowym. Badania wykonane przez Guengerich i wsp. [107] udowodniły, że rapontygenina jest aktywnym inhibitorem enzymu CYP1B1. Enzym ten występu-

je w różnych guzach nowotworowych – głównie w guzie raka prostaty i piersi. Inhibicję zaobserwowano tylko dla enzymu CYP1A1 oraz CYP1B1.

1.4. Aktywność przeciwzapalna TR i jego pochodnych

Obecnie duże nadzieje wiązane są z przeciwzapalną aktywnością TR, mimo że mechanizm opisujący tę aktywność wydaje się być złożony. Badania Donnelly i wsp. [108] pokazały, że polifenol ten hamuje uwalnianie interleukiny IL-8 oraz ekspresję cyklooksygenazy COX-2 w komórkach nabłonkowych układu oddechowego. Badania te ujawniły również, że zarówno antagonistą receptora estrogenowego, jak i antagonistą glukokortykoidów nie zmniejsza aktywności przeciwzapalnej. Wynik ten dowodzi, że resweratrol ma prawdopodobnie niestereoidowe działanie przeciwzapalne. Dokładne badania pokazały, że związek ten hamuje podstawowe uwalnianie interleukiny z makrofagów pęcherzykowych pacjentów, będących palaczami tytoniu oraz chorujących na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, o odpowiednio 94% i 84%. Ponadto jest inhibitorem szlaku syntezy GMCF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) oraz cytokin, które są podstawowymi mediatorami powstawania procesów zapalnych. Murias i wsp. [66] zsyntezowali szereg hydroksylowych i metoksylowych pochodnych TR, w celu wykazania ich działania wobec cyklooksygenazy COX-2. Skuteczność działania tych związków była oceniona na podstawie pomiarów stężenia prostaglandyny-2. Stwierdzono szczególnie dużą selektywność działania pochodnych hydroksylowych – zwłaszcza 3,3',4',5-tetrahydroksystilbenu oraz 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksystilbenu jest większa, niż pochodnych metoksylowych. Ta selektywność jest nawet większa, niż celekoksylu – selektywnego inhibitora COX-2 wprowadzonego w ostatnim czasie na rynek farmaceutyczny. Murias i wsp. [66] wykonali także obliczenia w celu wykazania interakcji TR i jego pochodnych z centrum aktywnym COX-1 oraz COX-2. Otrzymane wyniki pokazały, że tylko hydroksylowe pochodne TR są zdolne do wiązania z centrum aktywnym tych enzymów. W ten sposób autorzy znaleźli ilościową interpretację korelacji między strukturą badanych związków, a ich zdolnością do inhibicji tych enzymów. Również Chen i wsp. [109] zsyntezowali kilka pochodnych TR, zawierających grupę pirydynową oraz acylową. Otrzymane związki testowano na myszach w celu wykazania ich aktywności przeciwzapalnej. Uzyskane wyniki jednoznacznie pokazują, że TR wykazuje największą zdolność do hamowania procesu zapalnego. Przeciwzapalne działanie TR stwierdzono również w przypadku leczenia nieswoistego zapalenia błony śluzowej jelit u szczurów [110]. TR podany szczurom w dawce 5-10 mg/Kg znacząco zmniejszał nasilenie procesu zapalnego, naciek neutrofilowy oraz ak-

tywność cytokinin [205]. Także w teście stanu zapalnego wywołanego karageniną, TR silnie hamował obrzęk łapy szczura w czasie ostrej, jak i przewlekłej fazy, zapalenia. Aktywność ta była wyższa, niż fenylobutazonu, a porównywalna z działaniem indometacyny.

TR jest również inhibitorem lipooksygenaz – enzymów uczestniczących w procesie powstawania leukotrienów i prostaglandyn. Kimura i wsp. [111] po raz pierwszy wykazali jego działanie inhibitorowe wobec lipooksygenazy 5-LOX. Wykazano, że polifenol ten hamuje całkowicie kaskadę reakcji prowadzących do syntezy silnych związków wywołujących stany zapalne – kwasu 5-hydroksy-6,8,11,14-eikozotetraenowego, kwasu 5,12-dihydroksy-6,8,10,14-eikozotetraenowego oraz leukotrienu LTC₄. Ponadto przeprowadzone badania pokazały, że TR jest inhibitorem lizozymu oraz β -glukuronidazy, która w dużych ilościach występuje w leukocytach.

Udowodniono, że TR wywiera silny efekt inhibicyjny wobec procesu generowania nadtlenu wodoru oraz rodnika nadtlenkowego w makrofagach [112]. Proces ten jest w komórkach człowieka efektywnie stymulowany przez aktywatory LPS i PMA. TR znacząco zmniejsza ilość kwasu arachidonowego, który jest głównym prekursorem mediatorów stanu zapalnego. Co więcej, TR wywiera silnie hamujący wpływ na proces aktywacji cyklooksygenazy COX-2, indukowanej przez LPS, PMA, lipooksygenazy oraz rodniki nadtlenkowe. W efekcie następuje zmniejszenie tempa syntezy prostaglandyn. Wyniki te pokazują, że TR regulując ilość kwasu arachidonowego oraz aktywność cyklooksygenazy COX-2, efektywnie eliminuje stany zapalne.

1.5. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa TR

Śród wielu udowodnionych eksperymentalnie właściwości biomedycznych TR, na szczególną uwagę zwraca potencjalne działanie przeciwwirusowe, anty-HIV, które można by wykorzystać, jako element terapii [113-117,205]. Jak już wspomniano, w organizmie ludzkim TR jest metabolizowany do pochodnych glukuronianowych. W pracy Wang i wsp. [113] metabolity te zsyntezowano *in vitro* i porównano ich właściwości cytotoksyczne oraz przeciwwirusowe z właściwościami wyjściowego polifenolu. Nie stwierdzono aktywności przeciwwirusowej dla pochodnych kwasu glukuronowego nawet w stężeniach większych niż 300 μ M. Autorzy sugerują, że działanie przeciwwirusowe glukuronianów *in vitro* może nie odzwierciedlać ich aktywności *in vivo*, gdyż dalsze losy tych pochodnych w komórkach nie są jeszcze dokładnie znane. Evers i wsp. [114] donieśli, że TR hamuje replikację wirusa cytomegalii (CMV) przez blokowanie receptora EGF (*Epidermal Growth Factor*) i przekazywanie sygna-

łu przez kinazę fosfatydyloinozytylu-3 (IP-3). Spośród doniesień o właściwościach przeciw-wirusowych resweratrolu wartę przytoczenia są wyniki badań, na temat jego skuteczności wobec wirusa opryszczki HSV-1 oraz HSV-2 [115], a także wirusa zapalenia wątroby typu B [116]. W pracy Docherty i wsp. [115] wykazano, że 12,5 % i 25 % krem zawierający TR, stosowany u myszy według określonych schematów i dostatecznie wcześnie, jest bardzo skuteczny w leczeniu tego wirusa [205]. Krem z resweratrolem był równie skuteczny, jak 5% krem z acyklowirem, a w przypadku zakażenia szczepem HSV-1, opornym na działanie acyklowiru, TR nie tracił swojej przeciwwirusowej aktywności. Zrozumienie działania TR przeciwko wirusowi HIV umożliwiły badania Heredia i wsp. [117]. Pokazano, że TR wykazuje synergistyczną aktywność wobec wirusa HIV-1. W szczególności – polifenol ten reguluje aktywność nukleozydów występujących w nici RNA wirusa. Przy stężeniu 10 mM TR nie był toksyczny wobec komórek zainfekowanych wirusem, redukował natomiast replikację wirionu w zakresie 20-30%. Podobną przeciwwirusową aktywność wykazał TR w liniach komórkowych PBMCs, zainfekowanych klinicznie wyizolowanym wirusem HIV. Dodatek tego polifenolu do zainfekowanych makrofagów skutkuje wzrostem stężenia nukleozydu ddI. W komórkach limfocytów T, zawierających wirion HIV-1 oraz nukleozyd ddI, TR wyraźnie hamuje namnażanie się wirusa. Wykazano, że TR wraz z nukleozydem ddI znacznie hamuje replikację czterech opornych na leki antywirusowe szczepów HIV. Finalnie, porównując aktywność przeciwwirusową TR o stężeniu 10 μ M oraz kwasu moczowego, stwierdzono, że polifenol wyraźnie hamuje namnażanie wirusa, podobnie, jak kwas moczowy przy stężeniu 100 mM.

1.6. TR jako substancja antyproliferacyjna oraz czynnik indukujący apoptozę

Apoptoza jest zaprogramowaną genetycznie śmiercią komórki, obejmującą szereg szlaków biochemicznych prowadzących do tej śmierci. Wcześniejsze badania wykazywały, że śmierć komórki jest spowodowana głównie przez czynniki zewnętrzne. Ostatnie badania Byun [118] pokazały, że istnieją wewnątrz komórki chemiczne mediatory, indukujące ten proces. Najczęściej powodują ją białka z rodziny kaspaz. W literaturze można spotkać się z dwoma mechanizmami tego procesu komórkowego. W jednym z nich wymienia się kaspazę-8 jako podstawowy mediator apoptozy, podczas gdy w drugim mechanizmie kaspaza-9 jest białkiem, które stymuluje zaprogramowaną śmierć komórki. W związku z tym, że komórki nowotworowe mogą ulegać degradacji w wyniku apoptozy, poszukiwane są związki naturalnie występujące w przyrodzie, które indukowałyby ten proces. Wykazano, że TR indukuje

śmierć komórki w wyniku bezpośredniego oddziaływania z receptorami zaangażowanymi w proces apoptozy. Clement i wsp. [119] pokazali, że wywołuje on apoptozę komórek nowotworowych, która jest uzależniona od receptora FasL. Jest to tzw. ścieżka zewnętrzna. W pracy tej pokazano, że TR wyraźnie zwiększa ekspresję genów receptora w komórkach HL-60 białaczki oraz komórkach T47D raka sutka. Ponadto autorzy wykazali, że apoptoza indukowana przez TR jest silnie zależna od przenoszenia sygnałów przez receptor. Praca Bernharda [120] ujawniła, że apoptoza komórek nowotworowych, związana z modulowaniem aktywności receptora FasL, silnie zależy od rodzaju komórek. Dowodzi to, że TR hamuje apoptozę w komórkach nowotworowych linii CEM-C7H2. Delmas i wsp. [121] pokazali z kolei, że apoptoza wywołana przez ten związek jest zależna od rozmieszczenia receptorów FasL w komórkach nowotworowych. Ponadto wykazano, że nie reguluje on ekspresji tego receptora na powierzchni komórki, powoduje natomiast powstawanie charakterystycznych skupisk receptora Fas oraz jego redystrybucję w komórkach SW480, bogatych w cholesterol oraz sfingolipidy. TR jest również aktywatorem drugiej ścieżki reakcji prowadzących do apoptozy – ścieżki wewnętrznej, zależnej od aktywności białek mitochondrialnych. Dorrie i wsp. [122] pokazali, że TR indukuje wzmoczoną apoptozę przez depolaryzację błony mitochondrialnej oraz aktywację kaspazy-9. Późniejsze badania Tinhofer i wsp. [123] ujawniły, że związek ten indukuje apoptozę komórek nowotworowych na nowej drodze mitochondrialnej, regulowanej bezpośrednio przez białka typu Bcl-2. Powyższe badania nad regulacją apoptozy przez TR pozwalają wywnioskować, że może on indukować PCD (*Programmed Cell Death*) poprzez jednoczesną aktywację kilku szlaków apoptotycznych. Występująca w mitochondrium syntaza protonowa F_0F_1 -ATPaza uczestniczy w syntezie ATP podczas oksydacyjnej fosforylacji. Zheng i wsp. [124] wykazali, że TR jest efektywnym inhibitorem tego enzymu zarówno w komórkach mózgowych, jak wątrobowych. Pokazano, że inhibicja ta jest niekompetycyjna. Zbadano również wpływ PC na aktywność kompleksu enzymatycznego i pokazano, że jest jego inhibitorem. Porównując aktywność TR i PC stwierdzono, że oba związki mają mały wpływ na inhibicję ATP-azy, która katalizuje proces rozpadu ATP. Przeprowadzone badania ujawniły, że apoptoza komórki może być związana z hamowaniem aktywności tego enzymu.

Rodzina Rb oraz E2F czynników transkrypcyjnych odgrywa ważną rolę w regulowaniu rozwoju cyklu komórkowego w fazie G1/S. Adhami i wsp. [125] udowodnili, że ścieżka Rb-E2F/DP reakcji stymulowanych przez TR może prowadzić do apoptozy komórki. Wykazano, że potraktowanie komórek A431 czerniaka przez TR w znaczący sposób zmniejsza ilość formy Rb czynnika transkrypcyjnego. Wynik ten jest najprawdopodobniej związany z zahamo-

wanie ekspresji całej rodziny czynników transkrypcyjnych E2F przez ten polifenol. Autorzy wysunęli sugestię, że tego typu właściwość TR może powodować hamowanie cyklu komórkowego w fazie G1/S. W pracy Kim i wsp. [126] pokazano, że działanie TR na komórki nowotworowe linii A549 powoduje nagłe zahamowanie fazy S cyklu komórkowego, co prowadzi do apoptozy. Ten przeciwwzrostowy efekt TR jest według autorów związany ze znaczącą inhibicją fosforylacji czynnika transkrypcyjnego Rb oraz zwiększaniem aktywności wewnątrzcząsteczkowego inhibitora Cdk cykli komórkowych. Jednym z genów odpowiedzialnych za hamowanie procesu nowotworzenia jest gen p53. Liczne badania potwierdziły wpływ TR na wzrost jego ekspresji. Huang i wsp. [127] wykazali, że TR indukuje apoptozę tylko w komórkach zawierających gen p53, natomiast nie zaobserwowano różnicy w szybkości apoptozy, indukowanej przez TR w limfoblastach oraz komórkach ubogich w sfingomielinę. Otrzymane wyniki po raz pierwszy pokazały, że TR jest efektywnym induktorem apoptozy, dzięki zdolności do aktywacji genu p53. Badania przeprowadzone przez Hsieh i wsp. [68] dowiodły, że TR hamuje namnażanie komórek śródbłonna w tętnicach płucnych. Autorzy uważają, że może mieć to związek z silną inhibicją cyklu komórkowego w fazie S i G2 oraz ze zwiększaniem ekspresji genu p53. Również badania Lu i wsp. [128] udowodniły, że TR oraz jego hydroksylowe pochodne efektywnie indukują ekspresję genów p53, GADD45 oraz Bax. Ponadto związek ten stymuluje hamowanie ekspresji genu Bcl-2 w ludzkich fibroblastach, zmienionych w wyniku wprowadzenia do nich wirusa SV40. Znaczne zwiększenie aktywności w genie p53 sugeruje, że jest on w głównej mierze odpowiedzialny za ekspresję genu Bax, indukowaną przez TR w zmienionych komórkach. Przeprowadzone ostatnio badania pokazały, że apoptoza wywoływana przez cytokiny jest związana z syntezą ceramidów. Scarlatti i wsp. [129] pokazali, że TR może hamować wzrost i wywoływać apoptozę w liniach komórkowych MDA-MB-231 wysoce złośliwego nowotworu mózgu. Ujawniono, że tym procesom towarzyszy wzrost stężenia ceramidów w komórce. W szczególności pokazano, że TR najprawdopodobniej indukuje syntezę *de novo* ceramidów oraz ułatwia hydrolizę sfingomieliny. Powstawanie ceramidów jest związane z aktywacją przez TR palmitynotransferazy — kluczowego enzymu uczestniczącego w syntezie ceramidów oraz sfingomieliny, która również uczestniczy w tym procesie. Przy użyciu specyficznego inhibitora palmitynotransferazy (L-cyklocysteiny) pokazano, że tylko ten inhibitor może przeciwdziałać efektom wywołanym przez TR. Otrzymane wyniki dowiodły, że TR jest bardzo dobrym inhibitorem wzrostu guza nowotworowego oraz induktorem apoptozy dzięki zdolności do indukowania syntezy ceramidów. Bardzo aktywne chemoterapeutyki, takie jak taxol indukują apoptozę w wyniku bezpo-

średniego indukowania polimeryzacji tubuliny. Ostatnio przeprowadzono badania w celu sprawdzenia, czy TR nie posiada podobnych właściwości. Schneider i wsp. [130] pokazali, że związek ten oraz jego metoksyłowe pochodne już przy stężeniu 0,3 mM zmniejszają tempo namnażania komórek nowotworowych w liniach komórkowych Caco-2. Natomiast przy stężeniu wynoszącym 0,4 mM całkowicie hamuje proces nowotworzenia. Badania pokazały, że stereoizomery *cis* są prawie 100 razy bardziej aktywne w tym procesie, niż *trans*. Izomer *cis* przy stężeniu 0,3 mM hamuje cykl komórkowy w fazie G2/M oraz redukuje o połowę aktywność dekarboksylazy ornitynowej i adenozyne-melatoninowej. W efekcie zmniejsza się w komórkach rakowych ilość poliamin, takich jak putrescyna oraz spermina. Aminy te są podstawowymi czynnikami wzrostu guza nowotworowego. Autorzy wykazali również, że stereoizomery *cis*, a w szczególności 3,5,4'-trimetoksystilben, częściowo hamują proces wiązania kolchicyny do tubuliny. Wynik ten pokazuje, że stereoizomery te albo częściowo wiążą się z miejscem aktywnym w tubulinie, albo modyfikują miejsca wiążące na zasadzie oddziaływania allosterycznego. Można przypuszczać, że badane pochodne TR mogą stanowić bardzo interesujące leki antymitotyczne, które efektywnie hamują polimeryzację tubuliny.

Jak wiadomo zarówno GMP (guanozynomonofosforan) jak i cAMP (cykliczny AMP) odgrywają dużą rolę w regulacji procesu powstawania komórek. Okazuje się, że TR może również wpływać na tempo ich powstawania poprzez regulowanie ilości GMP oraz cAMP w cytozolu. El-Mowafy i Alkhalafa [131] badali wpływ TR na aktywność cykazy adenyłowej i guanyłowej, enzymów które uczestniczą w kaskadzie cytotatycznych reakcji, zachodzących w komórkach MCF-7 raka piersi. Badania ujawniły, że TR przy stężeniu 0,8 μ M zwiększa poziom cAMP, natomiast nie ma wpływu na ilość GMP. Jest rzeczą interesującą, że nawet tak silne leki jak, aktynomycyna-D oraz tamoxifen wykazują mniejszą aktywność w procesie regulowania stężenia GMP oraz cAMP niż TR. Ponadto udowodniono, że stymulacja powstawania cAMP przez TR jest niewrażliwa na działanie całego spektrum fosfodiesteraz, inhibitora IBMX oraz rolipramu — specyficznego inhibitora cAMP. Inhibitory te natomiast w obecności TR zwiększają stężenie cAMP. Równoległe badania przeprowadzone przez tych autorów pokazały, że działanie antyproliferacyjne TR jest silnie modyfikowane przez inhibitory proteinowej kinazy A. Badania te pokazały, że TR jest agonistą wobec układu cAMP/kinaza proteinowa A. Ekspresja genu NAG-1, który jest elementem rodziny genów TGF- β jest silnie związana z aktywnością proapoptyczną, a w konsekwencji – antynowotworową. Badania przeprowadzone przez Baek i wsp. [132] ujawniły, że TR silnie indukuje ekspresję genu NAG-1 oraz apoptozę w sposób silnie zależny od stężenia. Dokładne badania

pokazały, że polifenol ten najpierw zwiększa ekspresję proteiny p53 hamującej wzrost guza, a następnie indukuje ekspresję genu NAG-1. Ponadto autorzy pokazali, że miejsca wiążące w proteinie p53 i promotorowy region w genie NAG-1 odgrywają kluczową rolę w kontrolowanej przez TR ekspresji tego genu. Interesujących wyników na temat aktywności apoptotycznej TR dostarczyła praca Opipari i wsp. [96]. W ich pracy opisano wpływ tego polifenolu na apoptozę komórek raka jajnika. Wyniki dowiodły, że hamuje on wzrost oraz indukuje apoptozę kilku linii komórkowych tego nowotworu. Według autorów działanie to jest związane ze zdolnością TR do usuwania z mitochondriów cytochromu c, formowania ciałek apoptotycznych oraz aktywacji kaspaz. Jednakże zastosowanie mikroskopii elektronowej przyczyniło się do poznania nowego sposobu indukowania śmierci badanych komórek przez TR. Ujawniono, że związek ten powoduje śmierć komórki na drodze autofagocytozy, a nie apoptozy. Wynik ten sugeruje, że TR posiada zdolność do indukowania programowanej śmierci komórki zgodnie z dwoma niezależnymi mechanizmami. Ostatnie badania ujawniają, że TR wykazuje aktywność przeciwproliferacyjną w stosunku do szerokiego spektrum nowotworów, a w szczególności: chłoniaków, raka szpiku kostnego, żołądka, okrężnicy, nerek, wątroby oraz płuc. Hamowanie proliferacji komórek nowotworowych jest głównie związane z aktywacją szlaków biochemicznych, które przy udziale kaspaz prowadzą do apoptozy komórki.

Kilka prac poświęconych jest aktywności przeciwproliferacyjnej TR wobec komórek B raka szpiku kostnego [133,134]. Billard i wsp. [133] zbadali wpływ tego polifenolu na krwinki białe, wśród których występują komórki nowotworowe. Ich badania wykazały, że TR hamuje ekspresję przeciwapoptotycznej proteiny Bcl-2 oraz jest inhibitorem syntazy tlenu azotu (II). Natomiast TR wykazuje mały wpływ na żywotność monojądrowych makrofagów występujących we krwi obwodowej. Również Roman i wsp. [134] donieśli o wpływie TR na namnażanie się komórek linii B, wyizolowanych z bardzo złośliwej postaci raka szpiku kostnego. W ich pracy tej pokazano również, że polifenol ten jest inhibitorem szlaków biochemicznych, prowadzących do syntezy NO(II). W efekcie tempo wzrostu guza zostaje zahamowane. Dorrie i wsp. [122] pokazali, że TR efektywnie hamuje proliferację ludzkich linii komórkowych Fas/CD95, jak i linii komórek B szpiku kostnego. Ponadto udowodniono, że TR indukuje zmniejszanie potencjału czynnościowego błony mitochondrialnej oraz zwiększa ilość kaspazy-9 we wrażliwych limfocytach w przypadku białaczki złośliwej. Najnowsze badania sugerują, że TR może hamować proliferację komórek raka okrężnicy [135-137]. Używając komórek HCT116 raka okrężnicy z dużą zawartością proteiny p53, Mahyar-Roemer i wsp. [135] wykazali, że zmniejszenie dynamiki proliferacji jest wynikiem wprowadzenia ko-

mórek na szlak apoptozy. Autorzy stwierdzili, że apoptoza jest niezależna od ilości białka p53 oraz aktywności receptorów błonowych, jest natomiast związana z regulowaniem aktywności mitochondriów. Wolter i Stein [136] donieśli, że TR hamuje wzrost i proliferację komórek Caco-2 raka okrężnicy w wyniku działania apoptotycznego. Stwierdzono, że jest to głównie związane ze zwiększaniem aktywności kaspazy-3 oraz ekspresją cykliny E i A oraz ze zmniejszeniem aktywności cykliny D1. Ponadto dowiedziono, że TR ulega bezpośredniemu włączeniu w fazę S i G2 cyklu komórkowego, powodując jego nagłe zakończenie, co prowadzi do śmierci komórki. Efekt ten zaobserwowano już przy bardzo małym stężeniu TR. Delmas i wsp. [121] analizowali molekularny mechanizm apoptozy komórek raka okrężnicy ze szczególnym zwróceniem uwagi na rolę receptora FasL w tym procesie. Pokazali oni, że TR w zakresie stężeń 10-100 μ M aktywuje wiele rodzajów kaspaz oraz wywołuje apoptozę w linii komórkowej SW480 raka okrężnicy. Liang i wsp. [137] donieśli, że TR efektywnie hamuje proliferację komórek HT-29 raka okrężnicy. Dowiedli oni, że proces ten jest związany ze zdolnością TR do wywoływania dezaktywacji kinazy proteinowej Cdc2 oraz zwiększania tempa fosforylacji tyrozyny. Otrzymane rezultaty dowiodły, że redukcja aktywności Cdc2 jest głównie związana z inhibicją kinazy Cdk7, natomiast umieszczenie TR w komórkach spowodowało obniżenie poziomu kinazy Cdk7, która jest odpowiedzialna za fosforylację Cdc2. Pokazuje to, że TR hamuje podział komórki w fazie G2 poprzez inhibicję aktywności kinazy Cdc7. Ding i Adrian [138] wskazali, że TR indukuje apoptozę komórek nowotworowych *Pancrosta* – jednego z bardziej złośliwych nowotworów szczytowej części płuc. Badania przeprowadzono w liniach komórkowych PANC-1 oraz ASP-1. Na podstawie wyników można stwierdzić, że polifenol ten jest efektywnym inhibitorem proliferacji tych linii komórkowych oraz zwiększa aktywność fazy sub-G0/G1 cyklu komórkowego. Atten i wsp. [139] wykazali na podstawie badań linii komórkowych KATO-III oraz RF-1, że TR hamuje proliferację komórek guza śluzówki żołądka. Hamowanie jest według autorów wynikiem aktywacji kinazy proteinowej C, która jest bezpośrednio zaangażowana w dezaktywację guza nowotworowego. Badania Holian i wsp. [140] pokazały, że TR w liniach komórkowych SNU-1 raka żołądka, stymulowanych obecnością nadtlenu wodoru, hamuje syntezę DNA oraz bierze udział w generowaniu anionorodnika ponadtlenkowego, który może uszkadzać nici DNA. Ponadto stwierdzono, że w komórkach tych zwiększa on aktywność syntazy NO, która jest odpowiedzialna za apoptozę badanych komórek. W w/w pracy badano również apoptozę komórek EC-9706 – stwierdzono, że proces ten odbywa się przez regulację stężenia białka Bcl-2 oraz genu apoptozy Bax. Ostatnio wykazano, że TR jest inhibitorem proliferacji komó-

rek raka prostaty, którego rozwój jest zarówno zależny, jak i niezależny od stężenia estrogenów [141-144]. Używając do badań następujących linii komórkowych: LNCaP, DU-145 oraz PC-3, Hsieh i Wu [141] wykazali, że stilbenoid ten przyczynia się do zmniejszania tempa podziału komórek w wyniku hamowania fazy G1/S cyklu komórkowego. Zbadanie mechanizmu apoptozy w tych komórkach ujawniło, że w obecności TR zmniejsza się stężenie antygenu raka prostaty PSA oraz nie ulega modyfikacji ekspresja genów receptora androgenowego. Lin i wsp. [142] pokazali, że polifenol ten indukuje apoptozę komórek DU45 raka prostaty w wyniku aktywacji proteinowej kinazy MAPK, zwiększania stężenia proteiny p53 oraz zwiększania szybkości fosforylacji seryny. Mitchell i wsp. [143] dowiedli, że TR w komórkach raka prostaty wrażliwych na obecność hormonów estrogenowych modyfikuje aktywność genów androgenowych i poziom markera raka prostaty (PSA). Natomiast badania Kampa i wsp. [144] ujawniły, że antyproliferacyjna aktywność tego związku jest związana ze zmniejszeniem stężenia NO. Kim i wsp. [126] pokazali, że TR hamuje wzrost komórek A549 ludzkiego raka płuc. Ich badania udowodniły, że TR w zależności od stężenia, hamuje podział komórki w fazie S oraz fosforylację czynnika transkrypcyjnego Rb. Ponadto, spektroskopia fluorescencyjna ujawniła, że TR jest induktorem apoptozy. Efekt ten został przez autorów przypisany aktywacji kaspazy-3 oraz hamowaniu aktywności transkrypcyjnej białka NF-κB. Prowadzono również badania nad wpływem TR na proliferację komórek raka wątroby. Delmas i wsp. [145] jako pierwsi zbadali zdolność tego związku do inhibicji procesu proliferacji komórek wątroby szczurów, wśród których wykryto obecność komórek nowotworowych. Badano również wpływ etanolu na aktywność TR. Badania jednoznacznie sugerują, że etanol zmniejsza aktywność antynowotworową TR. Ujawniono, że TR opóźniał wejście komórki rakowej w cykl mitotyczny, gdyż nie powodował hamowania włączania histydyny znakowanej izotopem ^3H w trakcie mitozy. Kozuki i wsp. [146] pokazali, że TR przy stężeniach 100 oraz 200 μM hamuje w sposób znaczący proliferację linii komórkowych AH109A raka wątroby oraz hamuje jego naciekanie na sąsiednie tkanki. Autorzy stwierdzili, że aktywność TR może być związana z jego aktywnością przeciwutleniającą. Również De Lédinghen i wsp. [147] wykazali, że TR szybko zmniejsza wzrost guza raka wątroby w linii komórkowej HepG2. W pracy tej zaproponowano mechanizm tłumaczący wpływ tego związku na proces rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych w obrębie wątroby. Badania ujawniły, w przeciwieństwie do innych prac, że TR indukuje śmierć komórek nowotworowych nie na drodze apoptozy, ale aktywacji czynnika transkrypcyjnego Akt-1. Ponadto w pracy tej wykazano, że TR nie zmniejsza ekspresji genu urokinazy oraz nie jest inhibitorem centrum aktywnego tego enzy-

mu. Aktywność antyproliferacyjna TR była również badana w stosunku do raka tarczycy oraz głowy [148,149]. Shih i wsp. [148] pokazali, że potraktowanie tym polifenolem komórek raka tarczycy prowadzi do apoptozy, która w tym przypadku jest związana z translokacją w jądrze komórkowym czynnika transkrypcyjnego ERK1/2. Wykazano, że polifenol ten zwiększa stężenie w komórkach białka p53 i czynnika transkrypcyjnego oraz przyczynia się do aktywacji fosforylasy seryny. Elattar i Virji [149] wykazali, że TR prowadzi do hamowania podziału komórek linii SCC-25 raka tarczycy oraz replikacji ich DNA.

Liczne prace dowodzą, że TR wykazuje aktywność chemoprewencyjną, której podstawowym objawem jest hamowanie mutagenazy. Sgambato i wsp. [150] ocenili antyproliferacyjną aktywność tego związku wobec spektrum różnorodnych komórek nowotworowych. Wykazali, że wyraźnie zwiększa on wskaźnik apoptozy, zmniejsza ilość wolnych rodników w komórce w obecności nadtlenu wodoru oraz zmniejsza fragmentację DNA, wywołaną stresem oksydacyjnym.

Ostatnie badania ujawniły, że TR ma zdolność do indukowania degradacji nici DNA w obecności jonów Cu(II). Ahmad i wsp. [151] pokazali, że polifenol ten katalizuje redukcję jonów Cu(II) do jonów Cu(I), której towarzyszy powstawanie produktu utleniania TR – wykazuje on podobne właściwości katalityczne. Natomiast Fukuhara i wsp. [61] pokazali, że rozpad nici DNA jest indukowany obecnością jonów Cu(II). W swojej pracy udowodnili, że polifenol ten jest zdolny do tworzenia kompleksów z jonami Cu(II), a rozpad nici DNA jest najprawdopodobniej spowodowany tworzeniem kompleksu Cu(II) z ditlenem.

1.7. Eksperymentalne i teoretyczne badanie struktury i właściwości antyoksydacyjnych TR oraz jego pochodnych

W ostatnich latach wiele wysiłku włożono w poznanie struktury TR [152-160]. Znaczący wkład w tym względzie wniosła praca Caruso i wsp. [152]. Na podstawie badań dyfrakcji rentgenowskiej ustalono, że TR w temperaturze pokojowej nie jest płaski, o czym świadczą wyznaczone kąty torsyjne ($\alpha = C_5-C_4-C_7-C_8$ oraz $\theta = C_7-C_8-C_9-C_{10}$) (**Rys.1.1.1.a**), wynoszące $3,0^\circ$ oraz $8,0^\circ$. Ponadto ujawniono, że w kryształach tego związku występują wiązania wodorowe pomiędzy grupami hydroksylowymi. Oddziaływania te oraz ruchy flip-flop grup hydroksylowych są według autorów odpowiedzialne głównie za odchyłanie geometrii resweratrolu od płaskiej konformacji. Oprócz badań eksperymentalnych, w pracy tej wykonano również obliczenia kwantowo-mechaniczne za pomocą metody DFT i funkcjonału Perdew i Wang (PWC) w celu potwierdzenia geometrii resweratrolu wyznaczonej eksperymentalnie.

Otrzymano następujące optymalne wartości kątów α i θ : $2,9^\circ$ oraz $7,2^\circ$. Bazując na zoptymalizowanej geometrii TR, autorzy wyznaczyli teoretyczną wartość bariery rotacyjnej. Wyznaczono również optymalne geometrie anionów TR i stwierdzono, że proton z grupy 4'-OH jest najbardziej labilny. Wyniki obliczeń optymalizacyjnych pozostają w zgodności z wynikami doświadczalnymi. W celu wyznaczenia teoretycznej struktury TR, Bernard i wsp. [53] wykonali obliczenia optymalizacyjne za pomocą metody DFT i Hartree-Fock (HF). Obliczenia z wykorzystaniem bazy 6-31G(d,p) pokazały, że związek ten jest płaski w próżni, natomiast wyniki uzyskane za pomocą metody HF wskazują, że związek ten charakteryzuje się geometrią zgiętą, co potwierdzają zoptymalizowane kąty torsyjne o wartości około 24° . Również obliczenia Xu i wsp. [154] wykonane za pomocą metody DFT pokazały, że TR i jego rodniki tlenowe są płaskie w próżni. Stosując w obliczeniach funkcjonal Becke3P89 oraz bazę funkcyjną 6-31G(d) Billes i wsp. [155] wyznaczyli optymalną geometrię tego związku. Dla geometrii w minimum energetycznym autorzy uzyskali kąty torsyjne wynoszące około 15° . Teoretyczne badania strukturalne nad TR za pomocą metod semi-empirycznych i HF w próżni, w stanie podstawowym oraz wzbudzonym były podjęte przez Del Nero i de Melo [156]. Obliczenia pokazały, że cząsteczka TR jest zgięta, co dowodzi wartość zoptymalizowanego kąta torsyjnego wynoszącego około 15° . Ponadto autorzy wskazali znaczące różnice w wartościach zoptymalizowanych kątów dla geometrii uzyskanej w stanie podstawowym i wzbudzonym. Przedstawione rozbieżne wyniki obliczeń optymalizacyjnych prowadzą do wniosku, że rzeczywista struktura TR nie została wyznaczona. W związku z tym, w niniejszej rozprawie, podjęto problem geometrii TR i zastosowano trzy niezależne metody kwantowo-mechaniczne oraz szerokie spektrum baz funkcyjnych, w celu wyznaczenia w globalnym minimum energetycznym najbardziej wiarygodnej struktury TR.

Oprócz prac eksperymentalnych, właściwości antyoksydacyjne TR oraz jego pochodnych były również zbadane za pomocą metod chemii kwantowej [157-160]. Queiroz i wsp. [157], stosując metodę DFT, wykazali zależność struktura-aktywność antyoksydacyjna dla dużej klasy polifenoli w próżni. Wyniki ich obliczeń dowodzą, że oderwanie wodoru od grup hydroksylowych znajdujących się w położeniu *para* jest energetycznie bardziej preferowane, niż od grup OH w położeniu *meta*. Obliczenia pokazały, że system π -elektronowy zapewnia energetyczną stabilizację rodników tlenowych oraz, że niesparowany elektron jest głównie zlokalizowany na atomach tlenu w położeniu *para*. Pokazano, że antyoksydacyjne właściwości badanych związków są głównie związane z dużą wartością energii stabilizacji 4-hydroksystilbenu, stanowiącego szkielet tych substancji. Podobne obliczenia oparte na meto-

dzie DFT, ale tylko dla TR w próżni, przeprowadził Cao i wsp. [158]. Ich obliczenia wykonane za pomocą B3LYP/6-31(d,p) po raz pierwszy pokazały, że TR jest antyoksydantem. Wykazano, że w związku tym grupa hydroksylowa 4'-OH jest bardziej reaktywna, niż pozostałe grupy OH z powodu efektu rezonansowego. Obliczenia optymalizacyjne ujawniły, że rodniki TR mają strukturę semichinonową, stabilizowaną przez rezonans oraz obecność wiązania winylowego. Autorzy stwierdzili również, że aktywność antyoksydacyjna tego związku jest głównie związana z dystrybucją gęstości spinowej oraz niesparowanego elektronu w badanych rodnikach. Antyoksydacyjne właściwości TR, jego metabolitu – PC oraz innych polifenoli były również badane przez Wright i wsp. [159]. Zastosowali oni metodę DFT, bazę LDBS (*Locally Dense Basis Set*) do obliczenia IP (Potencjał Jonizacyjny, *Ionization Potential*) oraz BDE (Entalpia Dysocjacji Wiązania, *Bond Dissociation Enthalpy*) dla tych związków w próżni. Na podstawie wyników obliczeń autorzy stwierdzili, że najbardziej preferowany mechanizm zmiatania wolnych rodników opiera się na transferze wodoru z polifenolu na rodniki. W pracy tej ujawniono, że wiązanie winylowe zmniejsza wartości BDE, gdyż umożliwia pełną delokalizację niesparowanego elektronu w rodnikach tlenowych. Porównując natomiast aktywność antyoksydacyjną badanych polifenoli wykazano, że są one słabszymi zmiataczami wolnych rodników, niż α -tekoferol (witamina E). Przeciwwutleniające właściwości TR i innych bioaktywnych substancji w próżni, medium wodnym oraz benzenowym były badane przez Lepolidini i wsp. [160]. Zastosowali oni funkcjonal B3LYP, bazę 6-311++G(3df,2p) oraz model solwacyjny SCRF-PCM w celu wyliczenia parametrów antyoksydacyjnych, takich jak potencjał jonizacyjny i entalpia dysocjacji wiązań O-H. W pracy tej również podjęto badania nad analizą konformacyjną oraz związkiem geometrii z aktywnością antyoksydacyjną. Badania wykazały, że: w TR wiązanie 4'-O-H jest najmniej trwałe, TR i jego rodniki mają geometrię płaską w globalnym minimum energetycznym. Ponadto stwierdzono, że: medium polarne zwiększa stabilność energetyczną TR i jego rodników fenoksylowych, w medium wodnym entalpia dysocjacji wiązania O-H przyjmuje większą wartość niż w fazie gazowej, natomiast potencjał jonizacyjny mniejszą. Autorzy pokazali również, że duży stopień delokalizacji elektronu w rodnikach oraz obecność wiązania winylowego przyczyniają się do zwiększenia podatności TR na jonizację. Badania Xu i wsp. [154] były poświęcone teoretycznemu mechanizmowi reakcji TR z rodnikiem peroksyhydroksylowym (OOH) w próżni za pomocą metody DFT. Zbadano mechanizm oparty na przeniesieniu atomu wodoru, jako formy rodnikowej z TR na ten rodnik. Wykazano związek struktury TR oraz jego rodników z aktywnością antyoksydacyjną. Udowodniono, że zarówno TR, jak i jego rodniki posiadają płaską

strukturę, która zapewnia efektywną delokalizację niesparowanego elektronu oraz układu π -elektronowego. Przeprowadzone obliczenia wykazują, że grupa 4'-OH w tym polifenolu jest najbardziej reaktywna, a wiązanie 4'-O-H słabsze od pozostałych. Ponadto pokazano, że wszystkie rodniki mają strukturę semichinonową, a 4'-O-rodniki są energetycznie bardziej trwałe niż 3-O oraz 5-O.

1.8. Oligomery oraz glukozydy TR wyizolowane z wina, owoców winorośli *Vitis vinifera* i orzecha ziemnego (*Arachis hypogaea*)

Ostatnio wiele grup badawczych zainteresowanych jest badaniem aktywności biologicznej oligomerów TR [161,162]. Pokazano, że wiele oligomerów wyizolowanych z roślin *Paeonia lactiflora*, *Paeonia suffruticosa* oraz *Paeonia moutan* wykazuje silne działanie biologiczne. W szczególności dowiedziono ich właściwości przeciwzapalnych [161], przeciwutleniających [161] oraz antynowotworowych [162]. Właściwości przeciwutleniające ϵ -winiferyny, gnetyny H oraz glukozydów, które występują w czerwonym winie zostały wykazane przez Kim i wsp. [163]. W pracy tej autorzy badali efekt działania związków w reakcji degradacji 2-deoksyrybozy oraz lipidów błonowych, wywołanej rodnikiem hydroksylowym, powstałym w reakcji Fentona. Ich badania dowiodły, że wszystkie analizowane oligomery oraz glukozydy są silniejszymi zmiataczami wolnych rodników niż TR. Również Privat i wsp. [164] badali w roztworze wodnym oraz rozpuszczalniku DMSO aktywność przeciwutleniającą oligomerów, wyizolowanych z czerwonego wina. Badania te pokazały, że wszystkie oligomery są efektywniejszymi przeciwutleniaczami, niż TR i inne jego hydroksylowe pochodne.

Vitrac i wsp. [165] po raz pierwszy wyizolowali z win brazylijskich *trans*- ϵ -winiferynę – dimer TR, *trans*- δ -winiferynę, *trans*-piceid oraz *trans*-astringinę za pomocą chromatografii cieczowej. Ich badania wykazały, że *trans*- δ -winiferyna, CR, *trans*-piceid oraz *trans*-astringina występują w największym stężeniu w czerwonym winie. W szczególności wino Merlot z roku 1999 oraz 2002 zawiera dużą ilość tych aktywnych składników. Również Guebailia i wsp. [166] wyizolowali z czerwonego wina pochodzącego z Algierii kilka związków polifenolowych, w tym dimer resweratrolu – pallidol, zawierający w swojej budowie unikatowy szkielet bicyklooktanowy. Pallidol badany był pod kątem aktywności przeciwutleniających przez He i wsp. [167]. Autorzy pokazali, że związek ten jest niezwykle silnym zmiataczem tlenu singletowego. Jego aktywność przeciwutleniająca była zdecydowanie większa niż TR. Ostatnio przeprowadzone badania wykazały silną aktywność biologiczną *trans*-piceidu –

3-O- β -D-glukozydu TR, występującego w największym stężeniu w czerwonym winie [165] oraz czarnej czekoladzie [2]. W szczególności udowodniono, że posiada on silne właściwości przeciwutleniające, antyagregacyjne oraz antynowotworowe [7]. Znaczący wkład w zbadanie aktywności przeciwutleniającej tej substancji wniosły badania Fabris i wsp. [168]. W ich pracy porównano aktywność tego związku z aktywnością TR oraz witaminy C. Stwierdzono, że *trans*-piceid i TR wykazują podobną zdolność do zmiatania szkodliwych rodników tlenowych. Badania przeprowadzone przez Fauconneau i wsp. [169] pokazały, że *trans*-astringina (*trans*-3',5,4',3-tetrahydroksystilbenylo-3-O- β -D-glukopiranozyd) wykazuje zdecydowanie większą aktywność przeciwutleniającą, niż *trans*-piceid oraz TR.

Wykrycie w winogronach i czerwonym winie związków o silnym działaniu biologicznym i, w efekcie, odpowiedzialnych za ich dobroczynne działanie, skierowało uwagę wielu badaczy na winorośl właściwą (*Vitis vinifera*). Jest ona, obok zboża, najstarszą rośliną uprawną. Resztki dzikiej winorośli znajdowano na wykopaliskach w południowo-zachodniej Azji, Europie, a w Izraelu znaleziono nawet nasiona winorośli pochodzące z epoki brązu. W skład owoców winorośli wchodzi: cukry, pektyny, garbniki, witaminy, związki polifenolowe. Natomiast tylko ciemne winogrona zawierają barwne antocyjany. Rodzynki zawierają głównie cukier inwertowany czyli, równomolową mieszaninę D(+)-glukozy i D(-)-fruktozy, 1,5% kwasu winowego i jabłkowego, pektyny, winiany oraz związki polifenolowe. Również nasiona winorośli mają potencjalne znaczenie lecznicze, gdyż zawierają olej jadalny wzbogacony w nienasycony kwas linolenowy, mający istotne znaczenie w profilaktyce chorób układu krążenia. Zainteresowanie tzw. „*paradoksem francuskim*” przyczyniło się do intensywnych badań nad składem i aktywnością biologiczną składników czerwonych win. Stwierdzono, że głównym składnikiem aktywnym tego napoju są polifenole, będące metabolitami, gdyż nie są syntezowane przez organizmy zwierzęce. Badania ostatnich lat pokazały, że związki te w niewielkiej tylko ilości występują w postaci wolnej, tzw. formie glikonowej. Większość tworzy połączenia z cukrami oraz kwasami organicznymi. Stąd w czerwonym winie związki polifenolowe występują głównie w postaci trwałych glukozydów oraz estrów. Najbardziej bogate w związki polifenolowe są wina czerwone, w których zidentyfikowano około 10 rodzajów polifenoli, taniny, 16 barwników antocyjanowych oraz związki flawonowe, będące głównie pochodnymi kwercetyny oraz kempferolu. Spośród związków polifenolowych, zawartych w czerwonych winach, w największym stężeniu występują: kwasy fenolowe (kumarynowy, cynamonowy, kofeinowy), flawonoidy (katechina, epikatechina, kwercetyna). W winie czerwonym występuje również TR. Stwierdzono, że najbardziej wartościowe gatunki win, bardzo

bogate w ten polifenol, pochodzą z małych winnic, gdzie wina wytwarzane są od wieków metodą tradycyjną, bez wyrafinowanych technologicznie sposobów np. filtrowania, które może obniżać jego stężenie. Wyższa wartość potencjału przeciwutleniającego czerwonego wina w porównaniu z winogronami może wynikać z następujących powodów:

- wartość potencjału była wyznaczana różnymi metodami,
- z leżakowania wina w dębowych beczkach, podczas którego następuje ekstrakcja związków o właściwościach przeciwutleniających z drewna,
- z zagęszczenia moszczu winnego w porównaniu z całym owocem.

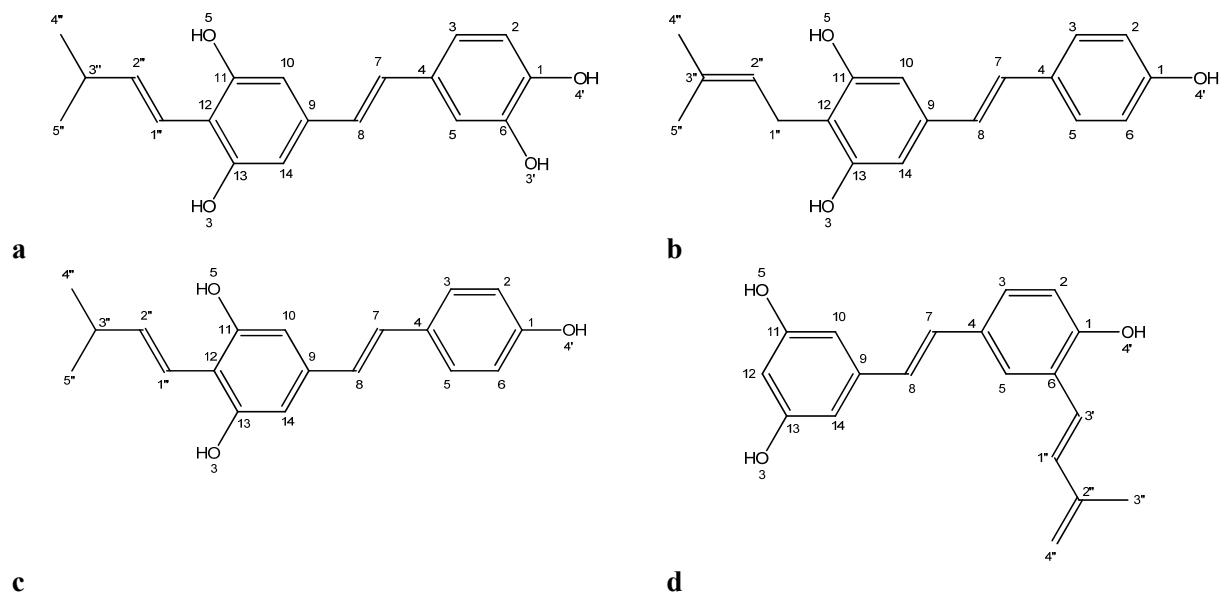
Badania ostatnich lat [15-17] pokazały, że oprócz prostych polifenoli, występujących w winie w postaci monomerów, w skład czerwonego wina i owoców winorośli wchodzi dimery, trimery oraz tetramery TR. Są one produktem oksydacyjnej polimeryzacji rodników tego polifenolu. Dimery TR możemy podzielić na dwie grupy. Związki należące do pierwszej z nich charakteryzują się obecnością w budowie heterocyklicznego pierścienia benzofuranowego. Do tej grupy zaliczamy: ϵ -winiferynę i δ -winiferynę [170], które mogą występować zarówno w postaci wolnej, jak i glukozydów. Ponadto w skład tej grupy wchodzi ϵ -winifuran, który zawiera szkielet furanowy. W skład drugiej grupy dimerów wchodzi związki, które nie zawierają pierścienia heterocyklicznego. Spośród najlepiej poznanych należy wymienić: pallidol, jego mono- i diglukozydy oraz parthenocysynę A. Ostatnio trimer TR- α -winiferyna został wyizolowany z czerwonego wina za pomocą chromatografii cieczowej oraz spektrometrii masowej. Cechą charakterystyczną budowy tego związku jest obecność trzech sprzężonych pierścieni benzofuranowych. Ponadto z rośliny *Vitis vinifera* wyizolowano tetramery. Podzielono je na trzy grupy:

- tetramery zawierające w swojej budowie szkielet bicyklo[6.3.0]undekanowy – przedstawicielem tej grupy jest winiferol A,
- tetramery zawierające w swojej budowie szkielet bicyklo[5.3.0]dekanowy. Spośród najlepiej poznanych tetrametrów z tej grupy należy wymienić: winiferol B, winiferol C, waticofenol A,
- związki, które posiadają pierścienie benzofuranowe oraz *trans*-2-arylo-2,3-benzofuranowe. Najważniejszymi przedstawicielami tej grupy są: witisifuran A oraz B, izo- i hopeafenol.

Vitrac i wsp. [165] opisali metodę bezpośredniego wykrywania polifenoli w czerwonych winach za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. W pracy tej przebadano 12 komercyjnie dostępnych win z południowej Brazylii i po raz pierwszy stwierdzono obecność w nich δ -winiferyny. Na podstawie przeprowadzonych badań przedstawiono, że wina

brazylijskie oprócz δ -winiferyny zawierają *trans*-astringinę, *trans*-piceid, TR, CR, ϵ -winiferynę. Przeprowadzona analiza ilościowa tych związków ujawniła, że wino Merlot zawiera około 10 mg/L δ -winiferyny, 15 mg/L CR oraz 13 mg/L *trans*-piceidu. Ponadto autorzy stwierdzili, że całkowite spożycie wszystkich stilbenoidów z badanych win wśród populacji brazylijskiej wynosiło 5,3 mg/L w przeliczaniu na jedną osobę. Również de Lima i wsp. [171], wykorzystując chromatografię cieczową zbadali skład 120 win z Portugalii i Francji. Stwierdzono, że stilbenoidy w największym stężeniu występują w winach czerwonych, a ich zawartość jest silnie skorelowana ze sposobem leżakowania oraz regionem, z którego ono pochodziło. Wyniki badań pokazały, że wszystkie polifenole występują głównie w postaci glukozydów, natomiast ich stężenie w formie wolnej jest bardzo małe. Ponadto, po raz pierwszy wyizolowano i scharakteryzowano *trans*-astringinę stwierdzając dużą zawartość tego glukozydu *trans*-PC we wszystkich rodzajach badanych win. Autorzy wniesli, że δ -winiferyna z uwagi na duże stężenie w winie powinna być zbadana pod kątem biodostępności oraz metabolizmu w komórkach organizmów żywych. Zawartość TR w winach pochodzących z Grecji była badana przez Geriogianniki-Christopoulou i wsp. [172]. Badane wina, zarówno białe jak i czerwone, były produkowane z greckich winorośli *Vitis vinifera*. Wyniki pokazały, że zawartość tego polifenolu w winie czerwonym jest zdecydowanie większa, niż w białym. Dokładne badania za pomocą metody HPLC ujawniły, że zawartość TR w winie czerwonym należy do przedziału 0,352-1,99 mg/L. Natomiast praca Lamuela-Revantos i wsp. [173] wykazała, że wina pochodzące z Ameryki Północnej i Południowej nie są bogate w TR, gdyż jego zawartość jest poniżej 1 mg/L. Badania Goldberg i wsp. [174] pokazały, że stężenie stereoizomerów resweratrolu w winie zależy od obecności β -glukozydazy, która katalizuje proces hydrolizy glukozydów, obficie występujących w winach. Autorzy zwrócili uwagę na fakt, że w procesie starzenia czerwonego wina aktywność tego enzymu maleje i, w efekcie w winach, o długim okresie leżakowania stężenie TR jest zdecydowanie mniejsze, niż jego glukozydów. Guebailia i wsp. [166], zbadali skład czerwonych win pochodzących z Afryki Południowej. W pracy tej wyizolowano i zidentyfikowano za pomocą spektroskopii NMR sześć polifenoli: *trans*-piceid (4,6-45 mg/L), TR (0,66-3,45 mg/L), *trans*- ϵ -winiferynę (0,2-1,2 mg/L), pallidol (0,2-9,2 mg/L), hopeaphenol (0,3-3,8 mg/L) oraz astilbinę (10,8-24,22 mg/L). Autorzy stwierdzili, że tak duża zawartość w czerwonym winie piceidu, pallidolu oraz astilbiny może świadczyć o silnym efekcie terapeutycznym win z tego rejonu. Ponieważ regularne picie czerwonego wina zapobiega wielu chorobom układu krążenia oraz odkładaniu blaszek miażdżycowych w naczyniach krwionośnych, wielu badaczy podjęło badania nad mechanizmem

jego aktywności biologicznej. Faustino i wsp. [174] zbadali wpływ ekstraktu z czerwonego wina Merlot na proces utleniania cholesterolu LDL. W szczególności zbadano aktywność antyoksydacyjną TR, katechiny, epikatchiny i rutyny. Utlenianie cholesterolu zostało wywołane przez AAPH (dihydrochlorek 2,2'-azo-bis(2-aminopropanu)) w roztworze wodnym. Generowane pod wpływem tego związku rodniki tlenowe uczestniczyły w procesie utleniania lipidów. Uzyskane wyniki pokazały, że wszystkie badane związki efektywnie hamowały ten proces, przy czym kwercetyna wykazywała największą aktywność. W pracy Tedesco i wsp. [175] badano ochronny wpływ czerwonego wina na proces utleniania ludzkich erytrocytów (RBCs) wywołany nadtlenkiem wodoru. Czerwone krwinki były traktowane mikromolowymi ilościami czerwonego wina. Następnie analizowano działanie aktywnych form tlenu, hemolizę, produkcję methemoglobiny. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że szkodliwe działanie rodników tlenowych jest efektywnie hamowane przez wino zawierające 3,5 mM kwasu galusowego. Ponadto stwierdzono, że wina zawierające duże ilości polifenoli efektywnie hamują destrukcyjne działanie rodników tlenowych, ale wykazują mniejsze działanie antyoksydacyjne, niż wina z dużą ilością kwasu galusowego. Podsumowując – autorzy stwierdzili, że niealkoholowe składniki czerwonego wina zapewniają przeciwutleniającą aktywność tego napoju.



Rys. 1.8.1. Pochodne TR wyizolowane z orzecha ziemnego (*Arachis hypogaea*) a) *trans*-arachidin-1, b) *trans*-arachidin-2, c) *trans*-arachidin-3, d) *trans*-3'-izopentadienylo-3,5,4'-trihidroksystilben

Ostatnio przeprowadzone badania dowiodły, że orzechy ziemne mają zdolność do syntezy rozmaitych fitoaleksyn o silnej aktywności biologicznej [176,177]. Spośród najważniejszych pochodnych TR na szczególną uwagę zasługują *trans*-arachidin-1, *trans*-arachidin-2,

trans-arachidin-3 oraz *trans*-3-izopentadienylo-4,3',5'-trihidroksystilben (**Rys.1.8.1**). Związki te są wydzielane w trakcie infekcji wirusowej lub grzybiczej. Badania Sobloleva [176] wykazały, że ich bogatym źródłem są nasiona. Pokazano także, że obecność grzybów z rodzaju *Aspergillus* indukuje wzmożoną syntezę tych substancji. Autorzy dowiedli, że tkanki nasion niezainfekowane grzybem bardzo intensywnie produkują TR, podczas gdy te zainfekowane produkują duże ilości pozostałych stilbenoidów. W przeprowadzonych testach po 48 godzinnym wzroście grzybów stwierdzono wzmożoną produkcję fitoaleksyn przez wewnętrzne tkanki nasion orzecha. Na uwagę zasługuje fakt, że nie zaobserwowano związku między syntezą stilbenoidów, a działaniem toksycznym grzyba. *Trans*-arachidin-1, *trans*-arachidin-2, *trans*-arachidin-3 oraz *trans*-3-izopentadienylo-4,3',5'-trihidroksystilben zostały również wyizolowane z ekstraktu metanolowego nasion orzeszków ziemnych za pomocą HPLC z odwróconą fazą przez Chang i wsp. [177]. Ich badania pokazały, że podczas inkubacji nasion zawartość *trans*-arachidinu-1, *trans*-arachidinu-2, *trans*-arachidinu-3 oraz TR stopniowo zwiększało się, podczas gdy stężenie *trans*-3-izopentadienylo-4,3',5'-trihidroksystilbenu po 28 godzinach wyraźnie się zmniejszało. Badając aktywność antyoksydacyjną tych substancji porównywano ją z aktywnością butylohydroksytoluenu (BHT). Zaobserwowano, że związki te w różnym stopniu przejawiają aktywność przeciwutleniającą. Po zastosowaniu ich jako pożywki w hodowli makrofagów RAW 264.7, wyizolowanych z wątroby myszy i aktywowanych przez liposacharyd (LPS) wykazano, że produkcja prostaglandyn oraz NO jest znacząco hamowana w obecności wszystkich analizowanych substancji. Uzyskane wyniki dowodzą, że składniki nasion orzeszków ziemnych są silnymi antyoksydantami, o potencjalnej aktywności przeciwzapalnej. Badacze stwierdzili, że duży potencjał leczniczy testowanych związków jest wynikiem obecności w ich strukturze kilku grup hydroksylowych oraz szkieletu izopentyloвого i izopentadienylowego.

1.9. Badania *in silico*

Badania *in silico* [178,179] mają na celu teoretyczne projektowanie nowych substancji o właściwościach leczniczych, których aktywność biologiczna jest następnie weryfikowana w badaniach eksperymentalnych. Na poziomie badań *in silico* wyznaczona jest optymalna struktura leku oraz sposób jego interakcji z receptorami. W poszukiwaniu takich substancji posługujemy się najczęściej kryterium trójwymiarowego podobieństwa strukturalnego między projektowanym związkiem, a substancją wzorcową o danej aktywności biologicznej. W pierwszym etapie jest wyznaczany środek masy – jest on dopasowywany numerycznie do środka

masy substancji wzorcowej. Następni jest generowana prosta regresji dla minimalnych kwadratów odległości między atomami. W kolejnym kroku wyznaczany jest współczynnik normalizacji dla zespołu atomów w cząsteczce w celu identyfikacji par atomów. Dla zidentyfikowanych par atomów obliczany jest średni pierwiastek kwadratowy z odległości między atomami. Innym wariantem poszukiwania nowych bioaktywnych substancji jest stosowanie procedury opartej na dwuwymiarowym podobieństwie. W schemacie tym jest porównywana nie geometria związku projektowanego oraz wzorcowego, ale obecność w nich grup funkcyjnych i innych elementów strukturalnych. W celu porównania 2D podobieństwa między strukturami obliczany jest współczynnik Tanimoto (TC, *Tanimoto Coefficient*) [178] z następującego wzoru:

$$TC = \frac{BitsAB}{BitsA + BitsB - BitsAB} \quad (1.1)$$

gdzie *BitsA* oraz *BitsB* oznaczają ilość elementów strukturalnych, występujących tylko w związkach A i B, podczas gdy *BitsAB* jest ilością podobnych elementów zarówno w związku A jak i B. Do obliczeń tego współczynnika brana jest pod uwagę ilość podobnych fragmentów struktury w analizowanych substancjach. Wartość TC zawarta jest w przedziale (0, 1) – im większa jego wartość, tym aktywność badanego związku jest bardziej zbliżona do aktywności wzorca. Ostatnio Füllbeck i wsp. [179] za pomocą metody *in silico* znaleźli nowe substancje, które mają potencjalną zdolność do indukowania apoptozy komórek nowotworowych. Substancje te wykazywały podobieństwo strukturalne do emodinu oraz kurkuminy. Jedną z substancji, dla której obliczono współczynnik Tanimoto był TR. Otrzymana dla niego wartość równa 0,7 dowodzi, że może być on efektywnym inhibitorem kinazy białkowej CK2 (*Casein Kinase*) oraz D.

Uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki mogą być potraktowane, jako wstęp do badań *in silico* substancji o aktywności przeciwutleniającej i przeciwnowotworowej. Badania te będą polegały na tym, że w pierwszym etapie wyznaczone zostaną za pomocą metod kwantowo-mechanicznych deskryptory aktywności biologicznej, zaprojektowanych, nieznanymi związków. Następnie za pomocą metod dynamiki molekularnej zbadana zostanie interakcja tych substancji z fragmentami wymodelowanych receptorów błonowych oraz centrami aktywnymi enzymów. W przypadku stwierdzenia, że modelowana teoretycznie substancja wykazuje wspomnianą aktywność, nastąpi jej synteza i weryfikacja aktywności w badaniach *in vivo* i *in vitro*.

2. CELE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Głównym celem pracy doktorskiej było teoretyczne zbadanie właściwości biofizykochemicznych TR i jego pochodnych. W szczególności podjęto następujące problemy badawcze:

1. Wyznaczenie za pomocą metod kwantowo-mechanicznych DFT, HF i MP2 z zastosowaniem różnych baz funkcyjnych struktury elektronowej TR, CR oraz innych bioaktywnych polifenoli i ich oligomerów występujących w przyrodzie, będących pochodnymi TR w globalnym minimum energetycznym i w stanie podstawowym.
2. Wyznaczenie najbardziej stabilnych energetycznie struktur rodnikowych, kationorodnikowych i anionowych TR i CR oraz ich hydroksylowych i metoksyłowych pochodnych. Zbadanie wpływu środowiska polarnego na ich stabilność i geometrię.
3. Wyznaczenie wartości bariery rotacyjnej, entalpii reakcji izomeryzacji *trans-cis* resweratrolu w próżni, medium wodnym i etanolowym za pomocą metody MP2 oraz zbadanie kinetyki i termodynamiki tej reakcji.
4. Zbadanie aktywności antyoksydacyjnej TR i CR w środowisku wodnym i etanolowym oraz korelacji struktura-aktywność antyoksydacyjna, w celu wyjaśnienia tzw. „*paradoksu francuskiego*”. Znalezienie związku geometrii szkieletu *trans*-stilbenowego z aktywnością antyoksydacyjną TR. W szczególności zbadanie wpływu konformacji płaskiej i zgiętej na właściwości antyoksydacyjne.
5. Zbadanie wpływu stereochemii i geometrii na aktywność antyoksydacyjną badanych związków. W szczególności porównanie właściwości antyoksydacyjnych stereoizomerów *cis* i *trans*.
6. Zbadanie aktywności antyoksydacyjnej oligomerów (dimery i trimery TR), β -O-glukozydów występujących w czerwonym winie, siarczanów(VI), 3-O-glukuronianu TR, hydroksylowych i metoksyłowych pochodnych TR, w celu wyjaśnienia leczniczych i prewencyjnych właściwości czerwonego wina oraz tzw. drugiego „*paradoksu francuskiego*”.
7. Wyznaczanie optymalnej geometrii, parametrów fizykochemicznych oraz energii stabilizacji kompleksów TR i CR z jonem Cu^{2+} , TR–Cu(II)–5'-monofosforan(V) tymidyny, TR-dinukleotyd oraz połączeń TR–Cu(II)–fosfolipid (*cis,cis*-2,3-dilinolenolan-1-fosforan(V) glicerolu), w celu wytłumaczenia antynowotworowej, antyproliferacyjnej i antylipemicznej aktywności TR i jego kompleksów z Cu(II).

8. Teoretyczne zbadanie mechanizmów reakcji TR z rodnikiem hydroksylowym i wyjaśnienie, który z analizowanych mechanizmów jest najbardziej preferowany w układach biologicznych z termodynamicznego punktu widzenia.
9. Przeprowadzenie termodynamicznej analizy rodnikowej inhibicji reduktazy rybonukleotydowej przez TR oraz hydroksymocznik.
10. Zbadanie oddziaływań wodorowych w kompleksach TR-H₂O za pomocą metody MP2 oraz DFT.

3. PODSTAWY TEORETYCZNE METOD KWANTOWO-MECHANICZNYCH

3.1. Układy otwartopowłokowe i problem kontaminacji spinowej

Dla stanów otwartopowłokowych stosujemy metodę nieograniczoną (*unrestricted method*) w celu dokonania poprawnego opisu energetycznego niesparowanego elektronu. Dla rozważanego przypadku elektrony α oraz β znajdują się na różnych spin-orbitalach, które w efekcie możemy zapisać, jako liniowe kombinacje funkcji bazowych:

$$\Phi_i^\alpha = \sum_n c_{ni}^\alpha \chi_n \quad (3.1.1)$$

$$\Phi_j^\beta = \sum_n c_{nj}^\beta \chi_n \quad (3.1.2)$$

Na podstawie powyższych wzorów, dwa zespoły współczynników rozwinięcia w macierzach Fock'a oraz macierzach gęstości, generują dwa zespoły orbitali cząsteczkowych. Opisują one proces dysocjacji, delokalizację orbitali w formach rezonansowych oraz inne właściwości elektryczne i magnetyczne form rodnikowych. Niestety, funkcje falowe otrzymane dla układów otwartopowłokowych nie są czystymi stanami, gdyż zawierają pewien udział stanów spinowych o różnej multipletowości. Funkcja falowa o dużym stopniu kontaminacji spinowej nie jest preferowana, gdyż nie jest funkcją własną operatora kwadratu całkowitego spinu i można ją zapisać, jako liniową kombinację stanów spinowych o wyższych multipletowościach. W teorii Hartree-Fock'a, elektronowa funkcja falowa może być aproksymowana wyznacznikiem Slater'a dla orbitali spinowych. Dla stanów otwartopowłokowych teoria HF prowadzi do równań dla orbitali α oraz β . W konsekwencji, istnieją dwie metody kwantowo-mechanicznego opisu stanów układów otwartopowłokowych. Jedna z nich – ROHF (Ograniczona metoda Hartree-Fock'a dla stanów otwartopowłokowych, *Restricted Open-Shell Hartree-Fock Method*) – pozwala rozpatrywać całkowicie podwójnie obsadzone stany α oraz β , natomiast druga metoda UHF (Nieograniczona metoda Hartree-Fock'a, *Unrestricted Hartree-Fock Method*) – wykorzystuje procedurę wariacyjną do opisu stanów niecałkowicie obsadzo-

nych. Ogólnie N-elektronową funkcję falową z metody HF możemy zapisać w sposób następujący [207]:

$$\Psi = \hat{A} \left[\prod_{i=1}^{N_\alpha} \Psi_i^\alpha(\vec{r}_i, \sigma_i) \prod_{j=1}^{N_\beta} \Psi_j^\beta(\vec{r}_j, \sigma_j) \right] \quad (3.1.3)$$

gdzie \hat{A} pełni funkcję operatora antysymetryzującego. Funkcja falowa (3.1.3) jest funkcją własną rzutowego operatora składowej z-owej spinu z wartością własną równą $(N_\alpha - N_\beta)/2$, gdzie N_α oznacza całkowitą ilość elektronów na orbitalu α , a N_β ilość elektronów na orbitalu β . W metodzie ROHF funkcja falowa pierwszych $2N_\beta$ spinowych orbitali może być zapisana w sposób następujący [207]:

$$\Psi_j^\alpha(\vec{r}_j) = \Psi_{j+N_\alpha}^\beta(\vec{r}_{j+N_\alpha}) \quad (3.1.4)$$

Metoda ROHF ma tę zaletę, że funkcja falowa jest funkcją własną operatora kwadratu spinu. Wartość średnia tego operatora w stanie opisanym funkcją elektronową HF może być zapisana w sposób następujący [208]:

$$\langle \hat{S}^2 \rangle = \left(\frac{N_\alpha - N_\beta}{2} \right) \left(\frac{N_\alpha - N_\beta}{2} + I \right) \quad (3.1.5)$$

Ta postać wartości średniej oznacza, że w metodzie ROHF funkcja falowa nie ulega kontaminacji spinowej i, w efekcie, praktycznie nie zawiera wkładów od stanów o wyższej multipletości. Natomiast w ujęciu UHF funkcja falowa nie jest funkcją własną kwadratu operatora spinu, gdyż w jej bazie wartość średnia operatora \hat{S}^2 jest wyrażona jako [208]:

$$\langle \hat{S}^2 \rangle = \left(\frac{N_\alpha - N_\beta}{2} \right) \left(\frac{N_\alpha - N_\beta}{2} + I \right) + N_\beta - \sum_{i,j} \left| \langle \Psi_i^\alpha | \Psi_j^\beta \rangle \right|^2 \quad (3.1.6)$$

Suma w powyższym równaniu jest miarą odstępstwa modelu UHF od modelu ROHF. Jeżeli orbitale α oraz β są identyczne, nie obserwujemy kontaminacji spinowej i funkcja UHF jest taka sama, jak funkcja ROHF. Kontaminacja spinowa przyczynia się do różnego traktowania elektronów na orbitalach α oraz β przy użyciu metod kwantowo-mechanicznych, stosowanych w obliczeniach. W teorii MP2 funkcja falowa dla stanów otwartopowłokowych jest traktowana jako stan referencyjny – wtedy efekcie kontaminacja spinowa jest w dużym stopniu uwzględniana. Natomiast w metodzie nieograniczonej, opartej na podejściu Kohna-Shama, za pomocą przybliżonych funkcjonalów korelacyjno-wymiennych, kontaminacja spinowa nie jest uwzględniana. Ponieważ nawet metoda ROHF uwzględnia w pewnym stopniu kontaminację spinową, opracowano następujące metody kwantowo-mechaniczne, pozwalające ją wyeliminować:

1. Metoda AUHF (*Annihilated UHF*) jest związana z anihilacją przyczynku spinowego z macierzy gęstości za pomocą procedury pola samouzgodnionego i anihilatorów Löwdin'a. Pomimo, że w tej metodzie kontaminacja spinowa nie jest całkowicie eliminowana, to w porównaniu z podejściem UHF uzyskujemy w niej zdecydowanie dokładniejszy opis stanów spinowych badanych układów.
2. Metoda PUHF (*Projected UHF*), w której anihilowane są wszystkie niekorzystne przyczynki spinowe z samouzgodnionej funkcji falowej UHF. Następnie energia układu jest obliczana, jako wartość własna w bazie funkcji rzutowych.

Zaletą tych metod jest możliwość ich bezpośredniego zastosowania do obliczeń *ab initio*, opartych na metodzie MP2. W celu dokładnego opisu wpływu kontaminacji spinowej na załamane symetrii funkcji spinowej, rozważmy wyznacznikową funkcję falową ROHF dla cząsteczki wodoru. Sześć tych funkcji możemy rozwinąć w szereg orbitali atomowych w sposób następujący [190]:

$$\begin{aligned}
\Psi_0 &= (\chi_A \chi_A + \chi_B \chi_B + \chi_A \chi_B + \chi_B \chi_A)(\alpha\beta - \beta\alpha) \\
\Psi_1 &= (\chi_A \chi_A + \chi_B \chi_B - \chi_A \chi_B - \chi_B \chi_A)(\alpha\beta - \beta\alpha) \\
\Psi_2 &= (\chi_A \chi_A - \chi_B \chi_B)(\alpha\beta - \beta\alpha) - (\chi_A \chi_B)(\alpha\beta + \beta\alpha) \\
\Psi_3 &= (\chi_A \chi_A - \chi_B \chi_B)(\alpha\beta - \beta\alpha) + (\chi_A \chi_B - \chi_B \chi_A)(\alpha\beta + \beta\alpha) \\
\Psi_4 &= (\chi_A \chi_B - \chi_B \chi_A)\alpha\alpha \\
\Psi_5 &= (\chi_A \chi_B - \chi_B \chi_A)\beta\beta
\end{aligned} \tag{3.1.7}$$

Natomiast funkcja falowa UHF stanu podstawowego ma postać następującą [190]:

$$\Psi_0^{UHF} = c(\chi_A \chi_A + \chi_B \chi_B)(\alpha\beta - \beta\alpha) + (\chi_A \chi_B \alpha\beta - c^2 \chi_B \chi_A \beta\alpha) + (c^2 \chi_B \chi_A \alpha\beta - \chi_A \chi_B \beta\alpha) \tag{3.1.8}$$

gdzie parametr c spełnia warunek $0 \leq c \leq 1$. Dodając i odejmując funkcje falowe Ψ_3 oraz Ψ_2 otrzymujemy czysty stan singletowy Ψ^1 oraz trypletowi Ψ^3 [190]:

$$\begin{aligned}
\Psi^1 &= (\chi_A \chi_A - \chi_B \chi_B)(\alpha\beta - \beta\alpha) \\
\Psi^3 &= (\chi_A \chi_B - \chi_B \chi_A)(\alpha\beta + \beta\alpha)
\end{aligned} \tag{3.1.9}$$

Nietrudno zauważyć, że ostatnie rozwinięcie Laplace'a wyznacznika funkcji UHF (3.2.9) odpowiada stanowi trypletowemu. Zatem, funkcja falowa UHF nie jest stanem czystym spinowo, gdyż zawiera wkłady od stanów o wyższej multipletowości, przyczyniające się do kontaminacji. Natomiast dla $c = 1$ funkcja falowa UHF ma identyczną postać, jak funkcja ROHF i w ten sposób funkcja UHF reprezentuje stan singletowy. Dla $c = 0$ funkcja UHF zawiera

wkład opisujący wiązanie kowalencyjne i poprawnie opisujący dysocjację – niestety zawiera ona również pewien udział stanu singletowego oraz tripletowego. Należy zaznaczyć, że w miarę wzrostu odległości między atomami, zmniejsza się wkład kontaminacji spinowej do całkowitej funkcji falowej. Ilościowy wkład kontaminacji spinowej jest dany przez wartość średnią kwadratu operatora spinu. Teoretyczna wartość średnia tego operatora dla czysto singletowego stanu wynosi 0, dla stanu dubletowego 0,75 oraz 2,00 dla stanu tripletowego. Ponieważ funkcja UHF może zawierać wkłady stanów o wyższych multipletowościach, wartość średnia kwadratu operatora spinu może się zwiększać dla stanu singletowego. Często wkłady stanów spinowych o dużej multipletowości są dominujące. Stopień mieszania się różnych stanów spinowych jest wyznaczony jako różnica energii pomiędzy czystym stanem spinowym, a stanem, który zawiera wkłady od stanów, o różnych multipletowościach. Różnica ta ulega często zmniejszeniu wzdłuż ścieżki reakcyjnej. Ponadto, energia aktywacji obliczona przy zastosowaniu UHF przyjmuje zawsze mniejsze wartości, niż obliczona za pomocą ROHF i może być obciążona dużym błędem z powodu kontaminacji spinowej. W efekcie, może to dramatycznie zmieniać kształt powierzchni energii potencjalnej (PES), która wygenerowana przy użyciu UHF może być płaska w obszarze stanu przejściowego.

3.2. Metoda rachunku zaburzeń Møllera-Plesseta

Metoda Hartree-Fock'a (HF) jest często wykorzystywana do wstępnej optymalizacji geometrii molekuly. Posiada ona pewne ograniczenia, wynikające z faktu, że nie opisuje poprawnie efektów korelacji elektronowej. Stąd w układach, dla których efekty te są duże, metoda HF, niestety, zawodzi. W związku z tym, powstało wiele metod kwantowo-mechanicznych, uwzględniających wkład korelacji elektronowej w opisie struktury elektronowej cząsteczki. Jedną z nich jest rachunek zaburzeń Møllera-Plesseta. Spośród wszystkich wersji tego rachunku najcenniejszy do opisu struktury elektronowej układów chemicznych jest drugi rząd rachunku zaburzeń, znany pod nazwą metody MP2. W teorii tej postać Hamiltonianu elektronowego jest zakładana w sposób następujący [211]:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \lambda \hat{V} \quad (3.2.1)$$

gdzie λ oznacza parametr perturbacyjny, H_0 jest Hamiltonianem niezaburzonym, podczas, gdy V jest perturbacją. H_0 jest też często określany, jako operator przesunięcia, który może być zapisany [211]:

$$\hat{H}_0 = \hat{F} + \langle \Psi_0 | \hat{H} - \hat{F} | \Psi_0 \rangle \quad (3.2.2)$$

$$\hat{H}_0 = \sum_{i=1}^N \hat{F}_i = \sum_{i=1}^N \left[\hat{h}_i + \sum_{j=1}^N (\hat{J}_j - \hat{K}_j) \right] \quad (3.2.3)$$

W teorii MP2 perturbacja reprezentowana przez potencjał korelacyjny może być zapisana w sposób następujący [211]:

$$\hat{V} = \hat{H} - \hat{F} - \langle \Psi_0 | \hat{H} - \hat{F} | \Psi_0 \rangle \quad (3.2.4)$$

gdzie \hat{F} jest operatorem Fock'a, a Ψ_0 oznacza znormalizowany wyznacznik Slater'a, który odpowiada najniższej wartości własnej operatora Fock'a. Operator ten w bazie funkcji Ψ_0 spełnia następujące równanie własne:

$$\hat{F}\Psi_0 = 2\Psi_0 \sum_{i=1}^{N/2} \varepsilon_i \quad (3.2.5)$$

W równaniu (3.2.5) N oznacza liczbę elektronów w rozważanym układzie, a ε_i energię orbitali podwójnie obsadzonych. Energia w zerowym rzędzie rachunku zaburzeń jest równa wartości średniej operatora H w bazie funkcji Ψ_0 , natomiast w pierwszym rzędzie rachunku zaburzeń jest równa zeru. Dowodzi to, że ścisła wartość energii obliczona w zerowym rzędzie jest równa energii otrzymanej w metodzie HF. Natomiast energia w pierwszym rzędzie rachunku zaburzeń jest dana następującym wyrażeniem:

$$E^1 = \langle \Psi_0 | \hat{V} | \Psi_0 \rangle \quad (3.2.6)$$

Rozważmy teraz problem wyznaczenia energii w drugim rzędzie rachunku zaburzeń. Ta poprawka energetyczna wymaga zastosowania elementów macierzowych operatora perturbacji, obliczonego między bazą referencyjnych funkcji HF oraz wszystkimi możliwymi stanami wzbudzonymi. Jeżeli do obliczeń zastosujemy orbitale kanoniczne, to elementy macierzowe obliczone w pojedynczo wzbudzonych stanach elektronowych są równe zeru, co można udowodnić następująco [190]:

$$\langle \Psi_0 | \hat{H}_0 - \sum_{j=1}^N \hat{F}_j | \Psi_i^a \rangle = \langle \Psi_0 | \hat{H}_0 | \Psi_i^a \rangle - \langle \Psi_0 | \sum_{j=1}^N \hat{F}_j | \Psi_i^a \rangle = \langle \Psi_0 | \hat{H}_0 | \Psi_i^a \rangle - \left(\sum_{j=1}^N \varepsilon_j \right) \langle \Psi_0 | \Psi_i^a \rangle = 0 \quad (3.2.7)$$

Zerowanie pierwszego elementu macierzowego w równaniu (3.2.7) jest konsekwencją zasad narzuconych przez teorię Brillouin'a, natomiast zerowanie drugiego elementu macierzowego wynika z faktu, że orbitale w elementach macierzowych są funkcjami własnymi operatora Fock'a i są wzajemnie ortogonalne. Poprawka drugiego rzędu rachunku zaburzeń, która jest pierwszym wkładem do energii korelacyjnej, wymaga obliczenia sumy po podwójnie wzbudzonych funkcjach falowych, wyrażonych przez wyznaczniki Slater'a. Poprawka ta jest gene-

rowana przez promocję dwóch elektronów z zajętych orbitali kanonicznych i oraz j na orbitale wirtualne a i b . Po wykonaniu obliczeń poprawka do energii elektronowej w drugim rzędzie rachunku zaburzeń może być zapisana następująco [190]:

$$W_2 = \sum_{i<j} \sum_{a<b}^{\text{zajetewirtual}} \frac{\langle \Psi_0 | \hat{V} | \Psi_{ij}^{ab} \rangle \langle \Psi_{ij}^{ab} | \hat{V} | \Psi_0 \rangle}{E_0 - E_{ij}^{ab}} = \sum_k a_k \langle \Psi^{(0)} | \hat{V} | \Psi_k \rangle \quad (3.2.8)$$

gdzie a_k jest współczynnikiem rozwinięcia pierwszej poprawki do funkcji w szereg funkcji bazowych. Natomiast energię w drugim rzędzie rachunku zaburzeń możemy obliczyć zgodnie ze wzorem [190]:

$$E_2 = \sum_{i<j} \sum_{a<b}^{\text{zajetewirtual}} \frac{\langle \Phi_i \Phi_j | \Phi_a \Phi_b \rangle - \langle \Phi_i \Phi_j | \Phi_b \Phi_a \rangle}{\epsilon_i + \epsilon_j - \epsilon_a - \epsilon_b} \quad (3.2.9)$$

podczas, gdy pierwsza poprawka do funkcji falowej ma postać [190]:

$$\Psi^{(1)} = \sum_k \left(\frac{\langle \Psi_k | \hat{V} | \Psi^{(0)} \rangle}{E^{(0)} - E_k} \right) \Psi_k \quad (3.2.10)$$

Na podstawie równania (3.2.9) elementy macierzowe pomiędzy orbitalami HF, a podwójnie wzbudzonymi stanami, można interpretować, jako całki dwuelektronowe. W efekcie, różnica całkowitej energii dwóch stanów jest równa różnicy energii orbitali molekularnych. Należy zaznaczyć, że obliczenie poprawki do funkcji falowej w drugim rzędzie rachunku zaburzeń, wymaga obliczenia poprawek do energii w wyższych rzędach niż drugi. W związku z tym, funkcja falowa zawiera przyczynki od wyznaczników, które są pojedynczo, podwójnie, potrójnie oraz poczwórnie wzbudzone. Niestety, koszt czasowy obliczeń za pomocą metody MP4, która uwzględnia wkłady od wyznacznikowych funkcji falowych potrójnie wzbudzonych jest porównywalna z kosztem metody oddziaływania konfiguracji CISD oraz sprzężonych klasterów z podwójnymi i potrójnymi wzbudzeniami (CCD, CCSD oraz CCSD(T)). Energia obliczona w czwartym rzędzie rachunku zaburzeń uwzględnia około 98% korelacji elektronowej. Ponadto, uwzględnienie w obliczeniach MP4 potrójnych wzbudzeń powoduje, że wkład energii korelacyjnej do całkowitej energii elektronowej jest podobny jak w metodzie SDQ (*Steepest-Descent Quench Method*). W praktycznych obliczeniach koszt czasowy obliczeń MP2 dla około stu funkcji bazowych jest porównywalny z kosztem obliczeń HF. Biorąc po uwagę fakt, że metoda MP2 pozwala uwzględnić 80-90% efektów korelacji elektronowej, należy stwierdzić, że metoda ta może być stosowana do optymalizacji geometrii układów, gdzie jest wymagane uwzględnienie korelacji elektronowej.

3.3. Funkcjonały korelacyjno-wymienne

Zasadnicza różnica między metodą DFT, a metodami *ab initio* tkwi w wyborze postaci funkcjonału korelacyjno-wymiennego oraz jego zależności od parametrów semi-empirycznych. Można udowodnić, że potencjał korelacyjno-wymieniczny jest słuszny dla wszystkich układów molekularnych, ale jego postać analityczna jest trudno osiągalna, za wyjątkiem specjalnego przypadku, jakim jest gaz elektronowy o stałej gęstości. Potencjały korelacyjno-wymienne powinny charakteryzować się następującymi własnościami:

1. Energia funkcjonalna powinna być wolna od wzajemnych interakcji. W energii wymiennej dla układu jednoelektronowego, jakim jest atom wodoru, nie powinna być uwzględniana energia kulombowska.
2. Dla stałej gęstości elektronowej powinien obowiązywać model oparty na stałej gęstości gazu elektronowego. Założenie to jest słuszne dla problemów fizyki ciała stałego – nie jest ono wymagane dla układów molekularnych.
3. Stała skalująca energię wymienną oraz współrzędne przestrzenne gęstości elektronowej powinna być liniowa. Wymagania te możemy zapisać następująco [190]:
$$\rho_{\lambda}(x, y, z) = \lambda^3 \rho(\lambda x, \lambda y, \lambda z) \quad E_x[\rho_{\lambda}] = \lambda E_x[\rho] \quad (3.3.1)$$
4. W obliczeniach czynnik skalujący λ powinien przyjmować wartość większą od jedności, gdyż wtedy następuje zwiększenie efektów korelacyjnych.
5. Potencjał korelacyjny powinien zachowywać się asymptotycznie jak r^{-1} . Ponadto, ten potencjał jako funkcja ilości elektronów nie jest funkcją ciągłą.
6. Potencjał korelacyjny powinien asymptotycznie dążyć do $-ar^{-4}/2$, gdzie a jest polaryzowalnością układu zawierającego $N-1$ elektronów.

Metody obliczeniowe bazujące na funkcjonalach korelacyjno-wymiennych są bardzo podobne do innych empirycznych metod kwantowo-mechanicznych oraz metod matematycznych, zawierających parametry semiempiryczne. W efekcie, jakość tych funkcjonałów zależy od wyboru semi-empirycznych parametrów oraz rodzaju badanego układu molekularnego. Ta metodologia powoduje, że metoda DFT zdecydowanie różni się opisem korelacji elektronowej od metod *ab initio*, takich, jak MP2 oraz sprzężonych klasterów. Energię korelacyjno-wymienną można rozseparować na dwa udziały – korelacyjny oraz wymienny, z których obydwa poprawnie opisują układy molekularne z uwagi na procedurę skalowania. Energia korelacyjno-wymienna zależna od całkowitej gęstości elektronowej może być zapisana jako:

$$E_{xc}[\rho] = \int \rho(r) \varepsilon_x[\rho(r)] dr + \int \rho(r) \varepsilon_c[\rho(r)] dr \quad (3.3.2)$$

Biorąc pod uwagę fakt, że energia korelacyjna jest dana jako suma przyczynków od elektronów α oraz β , tylko elektrony o tej samej orientacji spinu mają największy udział w korelacji elektronowej. W efekcie energia kinetyczna, energia oddziaływania elektron-jądro, elektron-elektron dla elektronów α oraz β mogą być w prosty sposób separowane. Ponadto, całkowita gęstość elektronowa jest sumą gęstości elektronów na orbitalach α oraz β , podczas gdy dla zamkniętego stanu singletowego gęstości elektronowe α oraz β są równe. Potencjały korelacyjno-wymienne mogą być aproksymowane gęstością elektronową w rozmaity sposób. Jednym z ważniejszych przybliżeń jest przybliżenie LDA (Przybliżenie lokalnej gęstości, *Local Density Approximation*). Zakłada ono, że gęstość elektronowa może być traktowana lokalnie, jako niezmienny gaz elektronowy. Energia korelacyjna i funkcjonal korelacyjny w tej metodzie są dane następującymi formułami [190]:

$$\begin{aligned} E_x^{LDA}[\rho] &= -C_x \int \rho^{4/3}(r) dr \\ \varepsilon_x^{LDA} &= -C_x \rho^{1/3} \end{aligned} \quad (3.3.3)$$

Formuła (3.3.3) wskazuje, że przybliżenie LDA wprowadza analityczną postać energii korelacyjnej, która została wyprowadzona przy założeniu, że gaz elektronowy ma stałą gęstość. W bardziej ogólnym przypadku, kiedy gęstości elektronowe α oraz β nie są równe, przybliżenie LDA może być pominięte i zastąpione przybliżeniem LSDA (lokalne przybliżenie gęstości spinowej, *Local Spin Density Approximation*), które posiada następującą postać [190]:

$$E_x^{LSDA}[\rho] = -2^{1/3} C_x \int (\rho_\alpha^{4/3} + \rho_\beta^{4/3}) dr \quad (3.3.4)$$

LSDA pozwala również na przedstawienie energii korelacyjnej, jako funkcji polaryzacji elektronowej w sposób następujący [190]:

$$\begin{aligned} \varepsilon_x^{LSDA} &= -C_x f(\zeta) \rho^{1/3} \\ f(\zeta) &= \frac{1}{2} \left[(1 + \zeta)^{4/3} + (1 - \zeta)^{4/3} \right] \end{aligned} \quad (3.3.5)$$

gdzie ζ oznacza polaryzację spinową. Dla stanów zamkniętopowłokowych przybliżenie LSDA jest tożsame z LDA. W przybliżeniu LDA potencjał korelacyjno-wymienny jest wyrażony następującym wzorem [214]:

$$V_{xc}^{LDA}(r) = \frac{\delta E^{LDA}}{\delta \rho(r)} = \varepsilon_{xc} \rho(r) + \rho(r) \frac{\partial \varepsilon_{xc}}{\partial \rho(r)} \quad (3.3.6)$$

Analityczna postać energii korelacyjnej dla gazu elektronowego o stałej gęstości może być wyprowadzona dla dwóch granicznych przypadków: dla maksymalnej i minimalnej gęstości elektronowej. Stosując model HEG (Model jednorodnego gazu elektronowego, *Homogeneous*

Electron Gas Model) energia korelacyjna w granicy maksymalnej gęstości może być wyrażona jako [214]:

$$\varepsilon_c = A \ln(r_s) + B + r_s [C \ln(r_s) + D] \quad (3.3.7)$$

podczas gdy, w granicy bardzo małych gęstości otrzymujemy [214]:

$$\varepsilon_c = \frac{I}{2} \left(\frac{g_0}{r_s} + \frac{g_I}{r_s^{3/2}} \right) \quad (3.3.8)$$

gdzie A , B , C , D , g_0 oraz g_I są dopasowywanymi parametrami. Dla pośrednich gęstości energia korelacji elektronowej może być wyznaczona z dużą precyzją za pomocą kwantowej wersji metody Monte Carlo. Energię korelacyjną zależną od polaryzacji spinowej za pomocą metody DFT można wyrazić następującym wzorem interpolacyjnym [190]:

$$\begin{aligned} \varepsilon_c(r_s, \xi) &= \varepsilon_c(r_s, 0) + \varepsilon_a(r_s) \frac{f_2(\xi)}{f_2^{(2)}(\xi)} (1 - \xi^4) + [\varepsilon_c(r_s, 1) - \varepsilon_c(r_s, 0)] f_2(\xi) \xi^4 \\ f_2(\xi) &= \frac{f_1(\xi) - 2}{2^{1/3} - 1} \end{aligned} \quad (3.3.9)$$

gdzie $\varepsilon_c(r_s, \xi)$ oraz $\varepsilon_a(r_s)$ są funkcjami parametryzowanymi, a pozostałe parametry we wzorze (3.3.9) są parametrami dopasowania. Na uwagę zasługuje promień Wiegner'a-Size, który jest związany z gęstością elektronową następującą zależnością:

$$\frac{4}{3} \pi r_s^3 = \frac{I}{\rho} \quad (3.3.10)$$

Perdew oraz Wang zaproponowali następującą analityczną postać energii korelacyjnej, zależnej od kilku parametrów dopasowania [190]:

$$\varepsilon_c = -2a\rho \left(1 + \alpha x^2 \right) \ln \left[1 + \frac{I}{2a(\beta_1 x + \beta_2 x^2 + \beta_3 x^3 + \beta_4 x^4)} \right] \quad (3.3.11)$$

gdzie x oznacza odległość międzyelektronową. Metoda LSDA pozwala na analityczne wyprowadzenie wzoru na energię korelacyjną tylko dla modelu gazu elektronowego, z pominięciem fluktuacji, wynikających z formuły interpolacyjnej energii korelacji. Dla systemów molekularnych aproksymacja LSDA zaniża energię korelacji o około 10%. Pomijając fakt, że metoda LSDA wprowadza duże uproszczenia w fundamentalnych założeniach, wyniki uzyskiwane na jej podstawie są zbliżone do wyników uzyskanych za pomocą metody HF. Główny sukces tej metody – spełnia ona warunek, aby całka dla dziur Fermiego była równa -1, a dla dziur Coulomba wynosiła 0.

3.3.1. Funkcjonały gradientowe

Przybliżenie LSDA wymaga modyfikacji uwzględniającej niejednorodności gęstości elektronowej. W tym celu należy uwzględnić zależność energii korelacyjnej zarówno od gęstości elektronowej, jak i pochodnej tej gęstości względem współrzędnej położenia elektronu. Pierwszym krokiem do poprawienia metody LSDA było opracowanie metod zwanych GGA (Ogólna metoda przybliżenia gradientów, *Generalized Gradient Approximation*). W metodach tych pochodne pierwszego rzędu gęstości względem współrzędnych przestrzennych są traktowane jako zmienne w funkcyjale korelacyjno-wymiennym – podobnie jest w przypadku przybliżenia LSDA. Najbardziej popularny funkcyjał GGA został wprowadzony przez Becke [191]. Uwzględnia on poprawkę korelacyjną do funkcyjału LSDA – dzięki temu energię korelacyjną w podejściu Becke możemy zapisać następująco [190]:

$$\begin{aligned}\varepsilon_x^{B88} &= \varepsilon_x^{LDA} + \Delta\varepsilon_x^{B88} \\ \Delta\varepsilon_x^{B88} &= -\beta\rho^{1/3} \frac{x^2}{1 + 6\beta x \sinh^{-1} x} \quad x = \frac{|\vec{\nabla}\rho|}{\rho^{4/3}}\end{aligned}\quad (3.3.1.1)$$

Parametr β jest wyznaczany za pomocą dopasowania z danych eksperymentalnych dla bardzo rozrzedzonego gazu atomowego. Spośród wszystkich wyprowadzonych funkcyjałów, najlepsze wyniki są uzyskiwane dla dwuparametrowego modelu OPTX (Model optymalnej wymiany, *Optimized Exchange*). Jednym z ważniejszych funkcyjałów, który w większym stopniu uwzględnia korelację elektronową jest funkcyjał LYP (Funkcyjał Lee, Yanga oraz Parra, *Functional Lee, Yang and Parr*) [192]. Funkcyjał ten posiada następującą postać analityczną [190]:

$$\begin{aligned}\varepsilon_c^{LYP} &= -4a \frac{\rho_\alpha \rho_\beta}{\rho^2 (1 + d\rho^{-1/3})} - \\ &ab\omega \left\{ \left[\frac{144(2^{2/3})C_F(\rho_\alpha^{8/3} + \rho_\beta^{8/3}) + (47 - 7\delta)|\nabla\rho|^2 -}{(45 - \delta)(|\nabla\rho_\sigma|^2 + |\nabla\rho_\beta|^2) + 2\rho^{-1}(11 - \delta)(\rho_\sigma|\nabla\rho_\sigma|^2 + \rho_\beta|\nabla\rho_\beta|^2)} \right] \frac{\rho_\alpha \rho_\beta}{18} \right. \\ &\quad \left. + \frac{2}{3}\rho^2(|\nabla\rho_\sigma|^2 + |\nabla\rho_\beta|^2 - |\nabla\rho|^2) - (\rho_\alpha^2|\nabla\rho_\beta|^2 + \rho_\beta^2|\nabla\rho_\alpha|^2) \right\}\end{aligned}$$

gdzie

$$\omega = \frac{e^{-c\rho^{-1/3}}}{\rho^{4/3}(1 + d\rho^{-1/3})} \quad \delta = c\rho^{-1/3} + \frac{d\rho^{-1/3}}{1 + d\rho^{-1/3}} \quad (3.3.1.2)$$

Parametry a , b , c , d w funkcyjale są wyznaczane za pomocą dopasowania danych dla atomu helu. Wada – nie uwzględnia on wkładu do energii korelacyjnej, pochodzącej od korelacji elektronów o spinach równoległych. Funkcyjał LYP może być natomiast kombinowany z

funkcjonałami Becke'a oraz OPTX w celu dokładniejszego opisu korelacji elektronowej. Perdew i wsp. [193] zaproponowali kilka funkcyjno-wymiennych, bazując na usuwaniu nieuzasadnionych członów oscylacyjnych z rozwinięcia Taylora energii korelacyjnej. W ten sposób dziury korelacyjne i wymienne mogą zostać scałkowane do wartości -1 lub 0. Spośród najważniejszych funkcyjno-wymiennych tej grupy na szczególną uwagę zasługują trzy funkcyjno-wymienne: PW91, PW89 oraz PBE. Charakteryzują się tym, że część wymienna może być w nich zapisana jako iloczyn funkcyjno-wymiennego LSDA oraz czynnika poprawkowego, który jest funkcją zmiennej x . Przykładowo, funkcyjno-wymienne PBE i funkcję poprawkową $F(x)$ możemy zapisać [190]:

$$\varepsilon_x^{PBE} = \varepsilon_x^{LDA} F(x) \quad F(x) = 1 + a - \frac{a}{1 + bx^2} \quad (3.3.1.3)$$

Natomiast funkcyjno-wymienne jest zapisany, jako suma funkcyjno-wymiennego LSDA oraz funkcji modyfikującej $H(t)$ [190]:

$$\begin{aligned} \varepsilon_c^{PBE} &= \varepsilon_c^{LDA} + H(t) & H(t) &= cf_3^3 \ln \left[1 + dt^2 \left(\frac{1 + At^2}{1 + At^2 + A^2 t^4} \right) \right] \\ A &= d \left[\exp \left(-\frac{\varepsilon_c^{LDA}}{cf_3^3} - 1 \right) \right]^{-1} & f_3(\xi) &= \frac{1}{2} \left[(1 + \xi)^{2/3} + (1 - \xi)^{2/3} \right] \\ t &= \left[2(3\pi^3)^{1/3} f_3 \right]^{-1} x \end{aligned} \quad (3.3.1.4)$$

Parametry a , b , c oraz d w powyższych funkcyjno-wymiennych są nieempiryczne i nie są otrzymywane przez dopasowanie z danych eksperymentalnych. Funkcyjno-wymienne KT3 (Funkcyjno-wymienne Keala-Tozera, *Keal-Tozer Functional*) został skonstruowany jako kombinacja funkcyjno-wymiennych LDA, OPTX oraz LYP. Ponadto, jest on zmodyfikowany przez dodatkowy człon uwzględniający gradient z gęstości elektronowej i może być zapisany tak [190]:

$$E_{xc}^{KT3} = aE_x^{LDA} + bE_x^{OPTX} + cE_c^{LYP} + \int \frac{|\bar{\nabla}\rho|^2 d}{\rho^{4/3} + e} \quad (3.3.1.5)$$

Współczynniki a , b oraz c w zależności (3.3.1.5) są optymalizowane w odniesieniu do wielkości eksperymentalnych, takich, jak energia atomizacji oraz parametry geometryczne, podczas, gdy współczynniki d i e są do dopasowane do widma NMR.

3.3.2. Funkcjonały gradientowe wysokiego rzędu

Opis korelacji elektronowej może zostać poprawiony przez uwzględnienie w funkcyjno-wymiennych wyższych pochodnych gęstości elektronowych względem współrzędnych położeniowych atomów. Alternatywnym sposobem na poprawienie energii

korelacyjno-wymiennej jest skonstruowanie funkcjonałów, będących funkcją kinetycznej energii orbitalnej τ , która dla pojedynczego orbitalu jest identyczna z postacią energii kinetycznej Weizsäcker'a (τ_w) [190]:

$$\tau(r) = \frac{1}{2} \sum_i^{zajete} |\vec{\nabla} \phi_i(r)|^2 \quad \tau_w(r) = \frac{|\vec{\nabla} \rho(r)|^2}{8\rho(r)} \quad (3.3.2.1)$$

Zależność orbitalnej energii kinetycznej od efektywnego potencjału jest następująca [190]:

$$\tau(r) = \frac{1}{2} \sum_i^{zajete} \varepsilon_i |\phi_i(r)|^2 - U_{eff}(r) \rho(r) + \frac{1}{2} \nabla^2 \rho(r) \quad (3.3.2.2)$$

Włączenie orbitalnej energii kinetycznej lub Laplasjanu gęstości elektronowej, jako zmiennych do funkcjonałów korelacyjno-wymiennych, prowadzi do generowania *meta-GGA* funkcjonałów. Jednym z ważniejszych funkcjonałów, w którym jest zawarta orbitalna energia kinetyczna jest funkcjonał BR (Funkcjonał Becke-Roussel'a, *Becke-Roussel Functional*). Posiada on następującą postać matematyczną [190]:

$$\varepsilon_x^{BR} = \frac{2 - (2 + ab)e^{-ab}}{4b} \quad (3.3.2.3)$$

gdzie parametry a , b oraz c spełniają następujące relacje:

$$a^3 e^{-ab} = 8\pi\rho \quad a(ab - 2) = b \frac{\nabla^2 \rho - 4(\tau - \tau_w)}{\rho} \quad (3.3.2.4)$$

Podobny funkcjonał korelacyjny zastał wprowadzony do chemii kwantowej przez Becke (Funkcjonał 95 Becke'a, *Functional 95 Becke*) [193]. Funkcjonał ten i poszczególne człony w nim zawarte mogą być zapisane jako [190]:

$$\begin{aligned} \varepsilon_c^{B95} &= \varepsilon_c^{\alpha\beta} + \varepsilon_c^{\alpha\alpha} + \varepsilon_c^{\beta\beta} \\ \varepsilon_c^{\alpha\beta} &= [1 + a(x_\alpha^2 + x_\beta^2)]^{-1} \varepsilon_c^{PW,\alpha\beta} \\ \varepsilon_c^{\sigma\sigma} &= [1 + bx_\sigma^2]^{-2} \frac{(\tau - \tau_w)_\sigma}{2^{5/3} C_F \rho_\sigma^{5/3}} \varepsilon_c^{PW,\sigma\sigma} \end{aligned} \quad (3.3.2.5)$$

W powyższych wzorach σ oznacza bazę funkcji spinowych α oraz β , x_σ jest zdefiniowane równaniem (3.3.2.5), a , b są parametrami dopasowanymi eksperymentalnie, natomiast ε_c^{PW} jest parametryzacją Perdew-Wang'a korelacyjnego funkcjonału LSDA. Kolejną rodziną funkcjonałów, które zawierają orbitalną energię kinetyczną oznaczamy akronimem HCTH. Funkcjonał VSXC (Funkcjonał Korelacyjno-Wymienny Voorhi-Scuserii, *Voorhi-Scuseria Exchange-Correlation*) należący do tej rodziny zawiera gęstość energii kinetycznej oraz 21 parametrów, które są dopasowane z danych eksperymentalnych.

3.3.3. Funkcjonały hybrydowe

Z definicji energii korelacyjno-wymiennej wynika, że istnieje związek pomiędzy energią, a potencjałem dziurowym. Związek ten jest widoczny w równaniu określanym, jako ACF (Prawo adiabatycznego połączenia, *Adiabatic Connection Formula*) [190]:

$$E_{xc} = \int_0^1 \langle \Psi_\lambda | V_{xc}^{hole}(\lambda) | \Psi_\lambda \rangle d\lambda \quad (3.3.3.1)$$

gdzie zmienna całkowania λ jest parametrem opisującym oddziaływania elektron-elektron. W bardzo uproszczonym przybliżeniu całka dana równaniem (3.3.3.1) jest obliczana, jako średnia w dwóch punktach i, w efekcie, może być zapisana w sposób następujący [190]:

$$E_{xc} \approx \frac{1}{2} (\langle \Psi_0 | V_{xc}^{hole}(0) | \Psi_0 \rangle + \langle \Psi_1 | V_{xc}^{hole}(1) | \Psi_1 \rangle) \quad (3.3.3.2)$$

Dla $\lambda = 0$ elektrony nie podlegają oddziaływaniu i, w konsekwencji, nie istnieje energia korelacyjna, tylko wymienna. Ponieważ ścisła funkcja falowa w tym przypadku jest jedynym wyznacznikiem Slater'a, ścisła wartość energii korelacyjno-wymiennej może być wyznaczona za pomocą metody HF. Generalnie, w metodzie funkcyjałów hybrydowych energia korelacyjna dana jest sumą energii korelacyjnej LSDA, ścisłej energii korelacyjnej oraz członów gradientowych. Podobnie, jak w tej metodzie, energia korelacyjna z dużą dokładnością może być obliczana przez dodanie do energii korelacyjnej LSDA poprawkowych członów gradientowych. Jest to podstawowa procedura stosowana w metodach hybrydowych. Do najbardziej znanych funkcyjałów hybrydowych zaliczamy B3 (Trójparametrowy funkcyjał Becke'a, *Becke 3 Parametr Functional*) oraz funkcyjał B3LYP, który może być zapisany w sposób następujący [190]:

$$E_{xc}^{B3LYP} = (1-a)E_x^{LSDA} + aE_x^{exact} + b\Delta E_x^{B88} + (1-c)E_x^{LSDA} + cE_c^{LYP} \quad (3.3.3.3)$$

gdzie parametry a , b oraz c są wyznaczone przez dopasowanie do danych eksperymentalnych i zależą od postaci energii korelacyjnej oraz wymiennej, wyznaczonej za pomocą metody GGA.

3.4. Dziury wymienne i korelacyjne w metodzie DFT

Ponieważ energia wymienna stanowi mały przyczynek do całkowitej energii korelacyjno-wymiennej, rodzi się pytanie, dlaczego nie jest ona liczona w sposób analityczny tak, jak energia kinetyczna, tylko w przybliżony i bardzo skomplikowany na poziomie metody DFT. Zastosowanie takiej metodologii daje, niestety, słabe wyniki, gdyż zasadniczy problem metody DFT tkwi w skomplikowaniu funkcyjału korelacyjno-wymiennej, który poprawnie opi-

sywałby wkłady energii korelacyjno-wymiennej do całkowitej energii układu. Energia wymienna na poziomie DFT może być wyznaczona w takim samym schemacie, jak w metodzie HF. Prowadzi to do potencjałów wymiennych, które w każdym punkcie zależą od gęstości w innym punkcie przestrzeni. Stąd definicja energii korelacyjnej i wymiennej na poziomie DFT jest lokalna tylko w małym obszarze. W przypadku szerszego zakresu, energia ta jest obliczana za pomocą funkcjonałów. Jak wiadomo, dwa elektrony odpychają się i oddziaływanie to opisuje potencjał Coulomba. Natomiast w relatywistycznej mechanice kwantowej oddziaływanie to ulega modyfikacji, gdyż uwzględniony jest połówkowy spin elektronowy. Na podstawie zakazu Pauliego stan kwantowy nie może być zajęty dwoma fermionami o tej samej orientacji spinu lub, inaczej mówiąc, funkcja falowa musi być antysymetryczna względem permutacji elektronów. Prowadzi to do energii wymiennej i jest traktowane, jako kwantowa poprawka do energii oddziaływania Coulomba. Ilościowa analiza problemu musi być przeprowadzona w oparciu o dziury wymienne. Jeżeli założymy, że elektron nie ma ładunku lub spinu, to prawdopodobieństwo jego znalezienia w dowolnym miejscu powinno być niezależne od położenia drugiego elektronu. W ten sposób gęstość elektronowa, pochodząca od pary elektronów, jest zależna od gęstości jednoelektronowej w sposób następujący [190]:

$$\rho_2(r_1, r_2) = \frac{N_e - 1}{N_e} \rho_1(r_1) \rho_1(r_2) \quad (3.4.1)$$

Po uwzględnieniu faktu, że elektrony mają ładunek oraz spin, gęstość dwuelektronową zapisujemy następująco [190]:

$$\rho_2(r_1, r_2) = \rho_1(r_1) \rho_1(r_2) + \rho_1(r_1) h_{xc}(r_1, r_2) \quad (3.4.2)$$

gdzie $h_{xc}(r_1, r_2)$ oznacza tzw. warunkowy czynnik prawdopodobieństwa. W chemii kwantowej nosi on też nazwę dziury korelacyjno-wymiennej i może być zapisany jako [190]:

$$h_{xc}(r_1, r_2) = \frac{\rho_2(r_1, r_2)}{\rho_1(r_1)} - \rho_1(r_2) \quad (3.4.3)$$

Dziura korelacyjno-wymienna reprezentuje zredukowane prawdopodobieństwo znalezienia elektronu 2 w pozycji 2 przy założeniu, że elektron 1 znajduje się w położeniu 1. Część wymienna tej dziury nazywana jest dziurą Fermiego, podczas, gdy dynamiczna część korelacyjna – dziurą Coulomba. Dziura Fermiego opisuje statyczną redukcję jednoelektronowej funkcji prawdopodobieństwa, natomiast dziura Coulomba redukuje prawdopodobieństwo znalezienia elektronu, znajdującego się w pobliżu elektronu źródłowego. Ponieważ efekt wymienny występuje tylko między elektronami o tej samej orientacji spinu, całkowita dziura uwzględnia

przyczynki od poszczególnych spinów. Jest rzeczą interesującą, że całka z dziury korelacyjno-wymiennej po współrzędnej r_2 jest równa -1, co pokazuje następujący rachunek [190]:

$$\int h_{xc}(r_1, r_2) dr_2 = \int \frac{\rho_2(r_1, r_2)}{\rho_1(r_1)} dr_1 dr_2 - \int \rho_1(r_2) dr_2 = \frac{N_e(N_e - 1)}{N_e} - N_e = -1 \quad (3.4.4)$$

Podobny argument dla separacji gęstości spinowej pokazuje, że dziura Fermiego jest wszędzie ujemna, a wartość całki równa -1 dowodzi, że całka z dziury Coulomba jest równa 0. Zasadnicza różnica w energii wymiennej, otrzymywanej przy zastosowaniu metody HF oraz DFT tkwi w tym, że w teorii HF energia ta zachowuje się nielokalnie a w teorii DFT lokalnie. Jest tak dlatego, że w metodzie HF dziury wymienne są zdelokalizowane na cały układ, natomiast w DFT zdelokalizowane dziury wymienne HF są całkowicie włączone do funkcjonałów.

3.5. BŁĄD SUPERPOZYCJI BAZY

Z uwagi na fakt, że bazy funkcyjne użyte do obliczeń są niekompletne, dla energii stabilizacji badanych kompleksów obliczono poprawkę BSSE (Błąd superpozycji bazy, *Basis Set Superposition Error*). Dowodzi to, że w granicznym przypadku kompletnej bazy BSSE jest równe zero. W obliczeniach praktycznych nie używamy, niestety, takiej bazy. Dlatego w celu stopniowej eliminacji BSSE należy stosować bardzo bogate bazy konsystentne rozmiarowo. Ponadto, z powodu dużego udziału oddziaływań dyspersyjnych, energię stabilizacji należy wyznaczać za pomocą metody MP2. Jest to ogromny problem, gdyż zastosowanie tej metody wymaga użycia bardzo dużej ilości funkcji bazowych w celu redukcji BSSE. Przybliżona wartość BSSE może być wyznaczona na gruncie metody CP (*Couterpoint Correction*) [194]. W metodzie tej BSSE jest obliczany, jako różnica energii monomerów oraz energii kompleksu. Należy pamiętać, że w kompleksie geometrie monomerów różnią się od geometrii izolowanych. Różnica energii dimeru oraz monomerów może być obliczona bezpośrednio i nazywa się energią kompleksowania. W celu obliczenia poprawki BSSE niezbędne są jeszcze cztery dodatkowe obliczenia. Stosując bazy dla monomerów oraz kompleksu, energia każdego monomeru jest liczona dla ich danej geometrii w układzie kompleksowym. Dwa dodatkowe obliczenia dla monomerów oraz kompleksu są następnie wykonywane w pełnej bazie. Ta procedura obliczeniowa oznacza, że energia jednego monomeru jest obliczana w dwóch normalnych bazach, zastosowanych do optymalizacji dwóch monomerów i zlokalizowanych w pozycjach jądrowych. Dzięki temu, energia monomeru A może być niższa, od energii monomeru B z powodu zastosowania tzw. odbitych orbitali, zlokalizowanych w różnych miejscach przestrzeni. Poprawka CP może być zdefiniowana w sposób następujący [190]:

$$\Delta E_{CP} = E(A)_{ab}^* + E(B)_{ab}^* - E(A)_a^* - E(B)_b^* \quad (3.5.1)$$

Na podstawie tej formuły energia stabilizacji poprawiona za pomocą metody CP może być obliczona, jako różnica energii stabilizacji baz korekty oraz ΔE_{CP} .

4. METODOLOGIA OBLICZEŃ KWANTOWYCH I WYNIKI

Wszystkie obliczenia przeprowadzono za pomocą pakietu obliczeniowego *Gaussian03W* [180]. Zastosowano następujące metody chemii kwantowej: DFT (Teoria Funkcjonału Gęstości, *Density Functional Theory*) [181], HF (Metoda Hartree-Fock'a, *Hartree-Fock Method*), MP2 (Rachunek Zaburzeń Drugiego Rzędu Møllera-Plesseta, *Møller-Plesset Second Order Perturbation Theory*) [182] oraz MP4 (rachunek zaburzeń czwartego rzędu Møller-Plesseta). Metodę MP2 zastosowano w celu uwzględnienia dużego wkładu energii korelacyjno-wymiennej do całkowitej energii układu oraz wpływu korelacji elektronowej na geometrię i energię badanych układów molekularnych. Natomiast metodę MP4 zastosowano w celu poprawienia energii korelacyjno-wymiennej, otrzymanej za pomocą MP2. Równowagową strukturę elektronową oraz energię każdego układu wyznaczono w stanie podstawowym, w próżni, medium wodnym oraz etanolowym. Do obliczeń wykonanych za pomocą metody DFT zastosowano funkcjonal hybrydowy B3LYP, który również uwzględnia efekty korelacji elektronowej. W pierwszym kroku, optymalizowano geometrię za pomocą metody HF, a następnie otrzymaną geometrię całkowicie optymalizowano za pomocą metody MP2(*full*). Zarówno w obliczeniach HF, jak i w trakcie reoptymalizacji geometrii HF za pomocą MP2 uwzględniono tę samą bazę funkcyjną.

Formy rodnikowe wygenerowano z równowagowych geometrii obojętnych molekuł poprzez usunięcie atomu wodoru z grup hydroksylowych, natomiast kationorodniki utworzono poprzez eliminację elektronu z równowagowej geometrii molekuly. Całkowitą optymalizację (*full optimisation*) geometrii układów otwartopowłokowych wykonano za pomocą funkcjonału hybrydowego B3LYP, gdyż otrzymane za jego pomocą orbitale molekularne są wolne od wkładów pochodzących od stanów o różnej multipletowości. Dla układów zamkniętopowłokowych (obojętne cząsteczki oraz formy anionowe) zastosowano metodę ograniczoną (*restricted method*), natomiast dla układów otwartopowłokowych (formy rodnikowe, kationorodniki oraz kompleksy TR–Cu(II)) – metodę nieograniczoną (*unrestricted method*) oraz RO (*restricted open-shell approach*). Podczas całkowitej optymalizacji układów otwartopowłokowych, wartość dla kwadratu całkowitego spinu była zachowana na poziomie 0,75. Tym samym, nie uwzględniono w trakcie obliczeń iteracyjnych kontaminacji spinowej. Wszystkie

częstości drgań harmoniczych skalowano przez współczynnik 0,973, natomiast energię drgań zerowych i poprawkę termiczną do energii skalowano przez współczynnik 0,9. Częstości skalowano w celu odzwierciedlenia różnicy między obliczonymi, a wyznaczonymi eksperymentalnie częstościami.

Ładunki cząstkowe na poszczególnych atomach obliczono korzystając z analizy NPA (Naturalna analiza ładunku, *Natural Population Analysis*, *NPA Analysis*) oraz analizy populacyjnej ładunku Mullikena [183]. Metoda Mullikena pozwala obliczyć ładunki cząstkowe na poszczególnych atomach badanych cząsteczek. Ładunki te są obliczane w wyniku równomiernego podziału nakrywających się orbitali pomiędzy dwoma atomami.

Zredukowana macierz gęstości rzędu k może być zapisana w sposób następujący [190]:

$$\gamma_k(r_1, \dots, r_k, r_1, \dots, r_k) = \frac{N_e}{k} \int \Psi^*(r_1, \dots, r_k, r_{k+1}, \dots, r_{N_e}) \int \Psi(r_1, \dots, r_k, r_{k+1}, \dots, r_{N_e}) dr_{k+1} \dots dr_{N_e} \quad (4.1.)$$

gdzie N_e oznacza całkowitą ilość elektronów. Dla poprawnego opisu struktury elektronowej największe znaczenie mają macierze gęstości pierwszego i drugiego rzędu, ponieważ operator Hamiltona zawiera operatory jedno- i dwuelektronowe. Macierz gęstości pierwszego rzędu może być diagonalizowana, a otrzymane funkcje własne należą do tzw. orbitali naturalnych (NO-*Natural Orbitals*). Koncepcja naturalnych orbitali prowadzi do analizy NBO (*Natural Bond Orbital*), którą do chemii kwantowej wprowadzili Weinhold i wsp. Macierz gęstości jest blokowa i diagonalizując kolejno jej bloki otrzymujemy bazę orbitali naturalnych, scentrowanych na poszczególnych atomach. Otrzymane orbitale są z reguły nieortogonalne i muszą być w kolejnym kroku zortogonalizowane za pomocą metody Löwdina lub Grama-Schmidta. Dla otrzymanej ortonormalnej bazy orbitali naturalnych wyznaczane są diagonalne elementy macierzy gęstości. Sumując wszystkie przyczynki od orbitali scentrowanych na poszczególnych atomach otrzymujemy na nich rozkład ładunków cząstkowych. Analiza NBO w porównaniu z analizą Mullikena jest dokładniejsza, ponieważ uwzględnia wkłady do całkowitego ładunku od elektronów rdzenia atomowego, walencyjnych oraz Rydberga, które są głównie zlokalizowane na orbitalach dyfuzyjnych. Ponadto analiza ta gwarantuje, że obsadzenie elektronowe spełnia zakaz Pauliego oraz, że zbieżność ładunków cząstkowych do wartości optymalnych jest zachowana nawet, gdy zwiększana jest ilość funkcji bazowych.

Optymalizacja geometrii była prowadzona w celu znalezienia na PES (Powierzchnia energii potencjalnej, *Potential Energy Surface*) punktu stacjonarnego, odpowiadającego geometrii równowagowej. W tym punkcie gradient sił jest równy zeru, gdyż reprezentuje on po-

łożenie równowagi. Podczas wykonywanych obliczeń były spełnione następujące kryteria zbieżności:

1. Siły będące pochodną potencjału względem współrzędnych miały wartość równą, w przybliżeniu, zero (dopuszczalna wartość nie większa niż 0,00045).
2. Średnia kwadratowa z sił (RMS, *Root-Mean-Square*) była równa w przybliżeniu zero (dopuszczalna wartość nie większa niż 0,0003).
3. Wartość odległości między kolejnymi krokami iteracyjnymi była mniejsza od 0,0018.
4. Średnia kwadratowa z odległości (RMS, *Root-Mean-Square Displacement*) przyjmowała wartość mniejszą od 0,0012.

Podczas optymalizacji geometrii obliczono w jej punkcie początkowym stałe siłowe, korzystając z tej samej bazy funkcyjnej i metody, jaką zastosowano do optymalizacji. Do obliczeń optymalizacyjnych stosowano zarówno współrzędne kartezjańskie jak i zredukowane współrzędne wewnętrzne, których zastosowanie skraca czas optymalizacji. W celu wyznaczenia geometrii badanych związków, w minimum globalnym generowano PES za pomocą HF/6-31G(d), B3LYP/6-31+G(d), B3LYP/6-31G(d), B3LYP/6-311G(d,p) oraz MP2(full)/6-31G(d) dla obojętnych związków. Otrzymana trójwymiarowa powierzchnia przedstawia zależność energii całkowitej od wartości skanowanych parametrów geometrycznych. Ponieważ orientacja atomów wodoru i tlenu z grup OH względem pierścieni aromatycznych jest bardzo ważnym parametrem geometrycznym, otrzymano również PES prezentującą zależność energii układu od kątów torsyjnych, opisujących tę orientację. Profil PES pozwolił znaleźć potencjalne minima lokalne. Geometrie w tych minimach były całkowicie zoptymalizowane bez narzucania ograniczeń na pozostałe parametry geometryczne i symetrię cząsteczki. W ten sposób, po całkowitej optymalizacji, uzyskana geometria była bardzo bliska geometrii w minimum globalnym. Do obliczeń stosowano następujące bazy funkcyjne:

1. 6-31G(d) – baza ta zawiera jedną funkcję polaryzacyjną na atomy niewodorowe. Stosowano ją do wstępnej optymalizacji złożonych układów molekularnych.
2. 6-31G(d,p) – baza ta zawiera funkcje polaryzacyjne typu d i p scentrowane na atomach wodoru. Była stosowana do optymalizacji geometrii TR.
3. 6-31+G(d,p) – jest to wzbogacona o funkcje dyfuzyjne baza 6-31G(d,p). Była również stosowana do optymalizacji struktury TR.
4. 6-311G(d,p) – baza ta zawiera funkcje polaryzacyjne d i p scentrowane na atomach wodoru. Stosowano ją do optymalizacji polifenoli, oligomerów, fosfolipidu, deoksyrybonukleotydów oraz układów otwartopowłokowych.

5. 6-311G+(d,p) – baza ta oprócz funkcji polaryzacyjnych scentrowanych na atomy wodoru zawiera funkcje dyfuzyjne na te atomy.
6. 6-311++G(d,p) – jest to wzbogacona o funkcje dyfuzyjne na atomy niewodorowe baza 6-311+G(d,p).
7. 6-311+G(2d,2p)-baza ta zawiera dwa zestawy funkcji polaryzacyjnych typu d na ciężkie atomy i dwa zestawy funkcji polaryzacyjnych p na atomy wodoru oraz funkcje dyfuzyjne na atomy wodoru. Była ona stosowana do badania oddziaływań wodorowych w kompleksach TR-H₂O.
8. 6-311G++(3df,2p) – baza ta zawiera trzy zestawy funkcji polaryzacyjnych typu d i f scentrowanych na ciężkich atomach oraz dwa zestawy funkcji polaryzacyjnych typu p scentrowanych na atomach wodoru. Zawiera też funkcje dyfuzyjne na atomy wodoru oraz atomy niewodorowe. Była ona stosowana do optymalizacji geometrii polifenoli za pomocą metody DFT oraz do obliczania dokładnych wartości energii.
9. lanl2DZ – baza ta była stosowana do optymalizacji wszystkich układów kompleksowych, zawierających jon Cu²⁺, gdyż zawiera ona ECP (Efektywny pseudopotencjał rdzenia atomowego, *Effective Core Potential*) który poprawnie opisuje energię elektronów rdzenia atomowego. Obliczenia wykonane za pomocą tej bazy pozwoliły częściowo uwzględnić efekty relatywistyczne, pochodzące od elektronów znajdujących się blisko jądra atomowego tych pierwiastków.
10. cc-pVDZ (*Correlation Consistent Polarized Valence Double Zeta Basis Set*), cc-pVTZ (*Correlation Consistent Polarized Valence Triple Zeta Basis Set*), cc-pVQZ (*Correlation Consistent Polarized Valence Quadruple Zeta Basis Set*) – są to uboższe od baz aug-cc-pVDZ, aug-cc-pVTZ oraz aug-cc-pVQZ korelacyjnie konsystentne bazy Dunninga. Były one stosowane do optymalizacji geometrii TR w próżni, obliczania barier rotacyjnych oraz dokładnych wartości energii stabilizacji kompleksów TR z wodą. Termin konsystentne korelacyjnie oznacza, że funkcje bazowe, które dają podobny wkład do energii korelacyjnej są włączone do tych bazy z tą samą wagą. Bazy z użyciem przedrostka aug są również korelacyjnie konsystentne i ich zaletą jest to, że są one, w porównaniu z bazami, cc wzbogacone w funkcje dyfuzyjne, posiadające małe współczynniki w członach eksponencjalnych. Baza aug-cc-pVDZ zawiera dodatkowe orbitale s, p oraz d, natomiast baza aug-cc-pVTZ posiada funkcje 1s, 1p, 1d oraz 1f na atomy wodoru oraz atomy niewodorowe.

W celu poprawnego opisu struktury elektronowej form anionowych, rodnikowych oraz kationorodnikowych podczas optymalizacji ich geometrii zastosowano bazy wzbogacone o funkcje dyfuzyjne. Również do optymalizacji obojętnych molekuł, zawierających atomy z wolnymi parami elektronowymi (S, N oraz O) zastosowano bazy wzbogacone o te funkcje. Do każdej zoptymalizowanej geometrii obliczono częstości harmoniczne w celu:

1. Badania natury punktu stacjonarnego na PES. Na podstawie wyznaczonych wartości częstości można stwierdzić, czy zoptymalizowana geometria jest w rzeczywistym minimum lokalnym, czy w punkcie siodłowym na PES.
2. Obliczenia ZPC (Poprawka zerowego punktu, *Zero-Point Correction*) oraz poprawki termicznej do całkowitej energii. We wszystkich wartościach energii przytaczanych w niniejszej rozprawie uwzględniono energię drgań zerowych (*Zero-point vibrational energy*).
3. Obliczenia wartości termodynamicznych funkcji stanu (całkowitej entalpii oraz entalpii swobodnej Gibbsa) w temp. 298,15 K i pod ciśnieniem 1 atm.

Częstości były obliczane analitycznie w wyniku diagonalizacji Hessianu za pomocą metody i w bazie użytej do optymalizacji geometrii. Charakterystyka punktu na PES jest następująca:

1. W przypadku braku urojonych częstości, zoptymalizowana geometria jest w lokalnym minimum energetycznym.
2. Uzyskana jedna częstość urojona dla zoptymalizowanej geometrii oznacza, że znajduje się ona w punkcie siodłowym lub reprezentuje TS (Stan przejściowy, *Transition State*). W przypadku uzyskania jednej częstości urojonej, nieznacznie modyfikowano geometrię zoptymalizowanej struktury charakteryzującej się obecnością tej częstości. Zmieniało parametry geometryczne, odpowiadające częstościom urojonym. Należy podkreślić, że otrzymanie jednej częstości urojonej nie zawsze oznacza, że otrzymaliśmy stan przejściowy, łączący produkty i substraty. Jest to spowodowane tym, że niejednokrotnie zoptymalizowana geometria, scharakteryzowana obecnością częstości urojonej łączy dwie geometrie w minimum energetycznym, które nie odpowiadają stabilnym geometriom produktów i substratów.
3. Jeżeli zoptymalizowana geometria charakteryzuje się obecnością kilku częstości urojonych oznacza to, że znajduje się ona w punkcie siodłowym wysokiego rzędu na PES. W takiej sytuacji, stosując komendę *opt=qst2* znajdowano geometrię stanu przejściowego, którą następnie, po modyfikacji omówionej w pkt 2, całkowicie optymalizowano w celu znalezienia geometrii w lokalnym minimum energetycznym.

Dla równowagowych geometrii badanych układów kompleksowych, w celu porównania ich trwałości energetycznej, obliczono ΔE_{stab} (Energie stabilizacji, *Stabilisation Energies*). Energię stabilizacji obliczono z zależności $\Delta E_{\text{stab}} = -(E_{\text{kompleksu}} - \sum E_{\text{monomer}})$ [184], gdzie $E_{\text{kompleksu}}$ oznacza energię elektronową kompleksu, natomiast E_{monomer} jest energią elektronową monomerów tworzących kompleks. W obliczonych wartościach energii stabilizacji nie uwzględniano poprawki deformacyjnej oraz sterycznej. W celu zbadania trwałości termodynamicznej kompleksów, obliczono zmianę entalpii swobodnej Gibbsa reakcji ich tworzenia, jako różnicę całkowitych entalpii swobodnych równowagowych geometrii kompleksów i tworzących ich monomerów.

Równowagowe geometrie izolowanych układów były optymalizowane w medium wodnym i etanolowym przy wykorzystaniu modelu solwatacyjnego C-PCM (*Conductor-Polarizable Continuum Model*) [185]. Dla wszystkich badanych związków zastosowano promień UAHF wnęki solwatacyjnej. Obliczenia wykonano w celu zbadania wpływu efektów solwatacyjnych na geometrię i energię badanych związków. W tym modelu badana molekula jest umieszczana we wnęce solwatacyjnej o zadanej średnicy, która składa się ze sferycznych powłok, otaczających każdy atom związku. Częsteczka umieszczona we wnęce oddziałuje ze środowiskiem zewnętrznym, a miarą tego oddziaływania jest pole elektrostatyczne, generowane przez ładunki polaryzacyjne, które są indukowane na ściankach wnęki solwatacyjnej. Wewnątrz wnęki względna stała dielektryczna ma taką samą wartość, jak dla próżni, natomiast na zewnątrz wnęki względna stała dielektryczna dla wody wynosiła 78,4, a dla etanolu 32,6. W modelu C-PCM przy zadanej wartości stałej dielektrycznej, ładunek solwatacyjny jest rozwiązaniem następującego równania [185]:

$$Sq = -f(\varepsilon)V \quad (4.2)$$

gdzie q oznacza ładunek solwatacyjny, V jest całkowitym elektrostatycznym potencjałem generowanym przez jądra atomowe pierwiastków, wchodzących w skład związku chemicznego, a z kolei $f(\varepsilon)$ jest funkcją stałej dielektrycznej. W ogólności, zakłada się, że $f(\varepsilon)$ ma następującą formę: $f(\varepsilon) = \varepsilon - 1/\varepsilon + X$, gdzie X jest równe zero lub 0,5 w zależności od zastosowanej geometrii cząsteczki. Najbardziej preferowana w obliczeniach jest wartość równa zero, ponieważ prowadzi ona do twierdzenia Gaussa dla ładunków solwatacyjnych [185]:

$$\sum_i q_i = -\frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon} Q_s \quad (4.3)$$

gdzie Q_s oznacza całkowity ładunek badanego układu. We wzorze (4.2) elementy macierzy S mają następującą postać:

$$S_{ii} = 1,0694 \sqrt{\frac{4\pi}{a_i}}, \quad S_{ij} = \frac{1}{|r_i - r_j|} \quad (4.4)$$

gdzie a_i oznacza wartość powierzchni wnęki. Równanie (4.2) jest rozwiązywane w sposób iteracyjny, a zbieżność jest zachowana. Iteracyjnie obliczane są kolejno ładunki z następującej zależności rekurencyjnej:

$$q_i^{(n)} = -\frac{1}{S_{ii}} \left[f(\varepsilon) V_i + \sum_{j \neq i} \frac{q_j^{(n-1)}}{|r_i - r_j|} \right] \quad (4.5)$$

Ze wzoru tego wynika, że i -ty ładunek zależy od potencjału generowanego przez substancję znajdującą się we wnęce solwatacyjnej oraz od potencjału pochodzącego od ładunków obliczanych w $n-1$ kroku iteracyjnym. W modelu C-PCM energia oddziaływania rozpuszczalnika z substancją rozpuszczoną jest obliczana ze wzoru:

$$E_{int} = \sum_i V_i q_i \quad (4.6)$$

gdzie V_i reprezentuje potencjał elektrostatyczny, pochodzący od i -tego ładunku. Ponieważ zależność ładunków solwatacyjnych od gęstości elektronowej w związku chemicznym jest z reguły liniowa, energia oddziaływania może być łatwo minimalizowana w schemacie obliczeniowym Kohna-Shama, gdyż jest ona funkcjonalem gęstości elektronowej. Przyjmując, że całkowita energia w próżni dana jest wzorem: $E^0 = E[\rho^0] + V_{NN}$, energię swobodną w rozpuszczalniku możemy wyliczyć z zależności:

$$F_{solv} = E[\rho] + \frac{1}{2} f(\varepsilon) V^\pm S^{-1} V \quad (4.7)$$

We wzorach tych V_{NN} jest energią oddziaływania jąder w badanym związku, ρ^0 jest gęstością elektronową cząsteczki izolowanej, ρ oznacza gęstość elektronową zaburzoną przez rozpuszczalnik, natomiast V^\pm jest sprzężoną po hermitowsku macierzą energii oddziaływania jąder. Należy podkreślić, że model ten, w porównaniu z innymi, pozwala na prostsze rozwiązanie trudnych problemów, związanych z oddziaływaniem substancji rozpuszczonej i rozpuszczalnika. W szczególności, w modelu tym, pochodne energii swobodnej względem współrzędnych jądrowych oraz częstości są obliczone przy wykorzystaniu bardzo zbieżnego i wydajnego algorytmu numerycznego.

Wpływ medium polarnego na geometrię i energię związków badano, wykorzystując również model COSMO (*Conductor-like Screening Model*) zaproponowany przez Klamt i wsp. [186]. Jest on nieiteracyjny i pozwala obliczać gradienty potencjału podczas optymalizacji, bez modelowania wnęki solwatacyjnej. Ładunki powierzchniowe w tym modelu obliczo-

ne są bezpośrednio z potencjału elektrostatycznego, opisującego rozkład ładunku. COSMO w porównaniu z innymi modelami solwatacyjnymi jest ulepszony pod względem numerycznym oraz pozwala na prostsze obliczanie gradientów. W modelu tym energia elektrostatyczna, mająca duży wkład w energii solwatacji, jest funkcją kwadratową rozkładu ładunku na powierzchni cząsteczki rozpuszczonej w medium wodnym i wprowadzona jest w sposób jawny do Hamiltonianu opisującego oddziaływania modelowego medium ze znajdującą się w nim substancją. Samouzgodniony proces optymalizacji rozkładu ładunku na powierzchni cząsteczki jest realizowany przez potencjał skanujący powierzchnię, który jest wprowadzony do cykli SCF. W związku z tym, metoda COSMO jest całkowicie wariacyjna. Energia ekranowania, pochodząca od dielektryka, jest skalowana za pomocą następującego czynnika: $(\varepsilon - 1)/(\varepsilon + x)$, gdzie ε jest stałą dielektryczną, a x czynnikiem skalującym. Efekty ekranowania w silnie polarnych mediach mogą być aproksymowane przez odpowiednie ciągłe medium, o stałej dielektrycznej równej $\varepsilon = \infty$. Rozważmy problem N punktowych ładunków w pozycjach r_i i otoczonych sferą, o promieniu R . Problem ten może być rozwiązany analitycznie za pomocą metody ładunku obrazowego. W efekcie, całkowita energia ekranująca wynosi [186]:

$$\Delta E = -\frac{1}{2} Q D Q \quad (4.8)$$

gdzie Q oznacza macierz ładunku, a D reprezentację macierzową operatora dielektrycznego, którego elementy możemy wyrazić następująco [186]:

$$D_{ij} = \frac{R}{(R^4 - 2R^2 r_i r_j + r_i^2 r_j^2)^{1/2}} \quad (4.9)$$

Na podstawie powyższych wzorów widzimy, że całkowita energia ekranowania składa się z energii pochodzącej od ładunku źródłowego Q oraz dodatniej energii, będącej wynikiem oddziaływania ładunków ekranujących, umieszczonych na sferze o promieniu R . Całkowita energia ekranowania w modelu COSMO jest równa sumie wszystkich przyczynków pochodzących od ładunków ekranujących, które są otoczone sferami o bardzo małym promieniu i stałej gęstości ładunku σ_μ . Niech S_μ oznacza całkowitą powierzchnię, a $q_\mu = S_\mu \sigma_\mu$ – ładunek pochodzący od bardzo małego wycinka sfery. Otrzymujemy stąd następujące wyrażenie na energię oddziaływania elektrostatycznego jednostkowego ładunku, znajdującego się w położeniu r_i z ładunkiem rozmieszczonym na powierzchni S_μ [186]:

$$b_{i\mu} = \frac{1}{S_\mu} \int \|r - r_i\|^{-1} d^2 r \quad (4.10)$$

oraz energię oddziaływania elektrostatycznego ładunków zgromadzonych na dwóch powierzchniach S_μ oraz S_ν :

$$a_{\nu\mu} = \frac{1}{|S_\nu||S_\mu|} \iint \frac{1}{\|r-r'\|} d^2r' d^2r \quad (4.11)$$

Dla $\mu \neq \nu$ energia elektrostatyczna (4.11) może być aproksymowana tak:

$$a_{\nu\mu} \approx \|t_\mu - t_\nu\|^{-1} \quad (4.12)$$

gdzie t oznacza położenie małego wycinka sfery. Diagonalne elementy, które reprezentują energię od poszczególnych wycinków sfery mogą być aproksymowane w sposób następujący:

$$a_{\nu\mu} \approx 3,8 |S_\mu|^{-1/2} \quad (4.13)$$

Finalnie, po zastosowaniu do obliczeń macierzy ładunku Q dla N źródłowych ładunków oraz macierzy q dla M powierzchniowych ładunków, całkowita energia układu może być wyrażona [186]:

$$E(q) = 1/2 QCQ + QBq + 1/2 qAq \quad (4.14)$$

gdzie A oraz B oznaczają macierze, których elementy stanowią energie elektrostatyczne (4.10) i (4.11) podczas gdy C jest macierzą Coulomba. Biorąc pod uwagę fakt, że ładunek ekranujący q^* minimalizuje tę energię otrzymujemy [186]:

$$\nabla_q E(q)|_{q^*} = BQ + Aq^* = 0 \quad (4.15)$$

gdzie q^* jest rozwiązaniem następującego równania macierzowego:

$$q^* = -A^{-1}BQ \quad (4.16)$$

Proste obliczenia prowadzą do następującego wyrażenia na energię ekranowania [186]:

$$E(\sigma^*) = 1/2 Q(C - BA^{-1}B)Q \quad (4.17)$$

Na podstawie wzoru (4.17) zauważamy, że wyrażenie na energię ekranowania dla wnęki solwatacyjnej o dowolnym kształcie jest identyczne z wyrażeniem otrzymanym dla wnęki sferycznej. Energia dana wyrażeniem (4.17), może być otrzymana po zastosowaniu warunków brzegowych, na mocy których potencjał elektrostatyczny znika na powierzchni przewodnika. Matematycznie warunek ten możemy napisać następująco: $\Phi=0$, gdzie Φ jest potencjałem wektorowym dla potencjału generowanego przez rozważane wycinki powierzchni. Wiedząc, że $\Phi=BQ+Aq$, gdzie BQ jest potencjałem pochodzącym od warstwy powierzchni, na której są rozmieszczone ładunki źródłowe, a Aq jest potencjałem generowanym przez powierzchnię z ładunkiem q , warunek $\Phi=0$ prowadzi bezpośrednio do warunku ekstremum (4.15). W celu uproszczenia obliczeń całkowitej dielektrycznej energii ekranowania, w modelu tym obliczo-

ne są analitycznie gradienty tej energii, względem każdego wektora położenia atomu. Postać analityczna tego gradientu jest następująca [186]:

$$\nabla_R AE = -q^*(\nabla_R B)Q + \frac{1}{2}q^*(\nabla_R A)q^* \quad (4.18)$$

Analizując powyższy wzór, należy stwierdzić, że pierwszy jego element reprezentuje wymianę oddziaływania między ładunkiem źródłowym, a ładunkiem ekranującym, podczas gdy drugi element reprezentuje wymianę oddziaływań, zachodzących tylko między ładunkami ekranującymi.

Właściwości przeciwutleniające analizowanych substancji zostały zbadane na podstawie następujących deskryptorów antyoksydacyjnych:

1. BDE (Entalpia dysocjacji wiązania, *Bond Dissociation Enthalpy*) wiązań O-H [159,160,189].
2. AIP (Adiabatyczny potencjał jonizacyjny, *Adiabatic Ionization Potential*) [159,160,189].
3. Gęstości spinowej na poszczególnych atomach w rodnikach fenoksylowych (rodniki zawierające niesparowany elektron na atomie tlenu grupy hydroksylowej) [158,189].
4. PDE (Entalpia dysocjacji protonu, *Proton Dissociation Enthalpy*) [189].
5. Energii poziomu HOMO [158]

Paramtry antyoksydacyjne wyznaczano dla równowagowych geometrii badanych związków na poziomie metody B3LYP/6-311G(d,p). Dobór tej bazy był podyktowany wynikami obliczeń, uzyskanymi przez Trouillas i wsp [222]. Dla szerokiego spektrum baz funkcyjnych wyznaczono w tej pracy BDE dla wiązania O-H w najprostszym fenolu i pirokatechiny(1,2-dihydroksybenzen, katechol). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dla bazy 6-311G(d,p) teoretyczne wartości BDE są w największej zgodności z danymi eksperymentalnymi. W celu poprawniejszego opisu efektu delokalizacji elektronu w rodnikach fenoksylowych i pary elektronowej w formach anionowych do obliczeń BDE, AIP oraz PDE stosowano bazę 6-311+G(d,p).

BDE obliczono, jako różnicę całkowitych entalpii atomu wodoru, równowagowych geometrii rodnika fenoksylowego oraz obojętnej cząsteczki przeciwutleniacza. Zmianę entalpii reakcji obliczono w warunkach standardowych, zgodnie z następującym równaniem, wynikającym z termochemicznego prawa Hessa:

$$\Delta_r H^0 = \sum (E_0 + H_{term})_{produkty} - \sum (E_0 + H_{term})_{substraty} \quad (4.19)$$

gdzie E_0 jest równe energii elektronowej, a H_{term} oznacza termiczną poprawkę do entalpii obliczoną zgodnie ze wzorem:

$$H_{term} = E_{tot} + k_B T \quad (4.20)$$

gdzie E_{tot} jest całkowitą energią molekularną, k_B jest stałą Boltzmanna, a T temperaturą bezwzględną. BDE jest miarą trwałości homolitycznej wiązania O-H w badanych układach. Im mniejsza wartość tego parametru, tym wiązanie jest słabsze i bardziej podatne na rozerwanie podczas interakcji z wolnym rodnikiem. BDE jest niezbędne do opisanie mechanizmu HAT (Mechanizm transferu atomu wodoru, *Hydrogen Transfer Mechanism*) [159,160] zmiatania wolnych rodników, opartego na transferze wodoru z obojętnej molekuly do rodnika. AIP obliczono, jako różnicę energii równowagowej geometrii kationorodnika, powstałego przez eliminację elektronu z tej molekuly oraz jej formy obojętnej. AIP jest miarą podatności antyoksydanta na oddawanie elektronu (jonizacji) podczas interakcji z wolnym rodnikiem w układach biologicznych. Im mniejsza wartość tego parametru, tym badany związek posiada silniejsze zdolności elektronodonorowe i, tym samym, jest silniejszym antyoksydantem. AIP może być zastosowany do opisu mechanizmu ET (Mechanizm transferu elektronu, *Electron Transfer Mechanism*) – zmiatania wolnych rodników, opartego na przeniesieniu elektronu z antyoksydanta do rodnika [159,160].

Wartości PDE były otrzymane, jako różnice całkowitej entalpii protonu, równowagowej formy anionowej oraz obojętnej cząsteczki. PDE jest miarą zdolności przeciwutleniacza do oddawania protonu na skutek dysocjacji jonowej. Im mniejsza wartość tego parametru, tym większa zdolność do wymiatania wolnych rodników i podatność wiązania O-H na rozpad heterolityczny. Wartości PDE determinują mechanizm PT (Transfer Protonu, *Proton Transfer*), zgodnie z którym, interakcja z wolnym rodnikiem oparta jest na przeniesieniu protonu z obojętnej molekuly na rodnik.

Gęstości spinowe na poszczególnych atomach obliczono dla równowagowych geometrii rodników fenoksylowych. Wartość gęstości spinowej jest silnie skorelowana ze stabilnością energetyczną rodnika, gdyż im mniejsza wartość tego parametru, tym ta stabilność jest większa. Wygenerowano również trójwymiarowy rozkład tej gęstości w rodnikach. Miejsca o dużej koncentracji gęstości są bardzo podatne na atak rodnika. W celu porównania aktywności antyoksydacyjnej TR w analizowanych mediach, obliczono energię poziomu HOMO. Im większa wartość tej energii, tym związek wykazuje większą aktywność antyoksydacyjną, gdyż jest bardziej podatny na jonizację.

Oceny samorzutności badanych reakcji dokonano, obliczając w warunkach standardowych zmianę entalpii swobodnej Gibbsa, zgodnie z równaniem:

$$\Delta_r G^0 = \sum (E_0 + G_{term})_{produkty} - \sum (E_0 + G_{term})_{substraty} \quad (4.21)$$

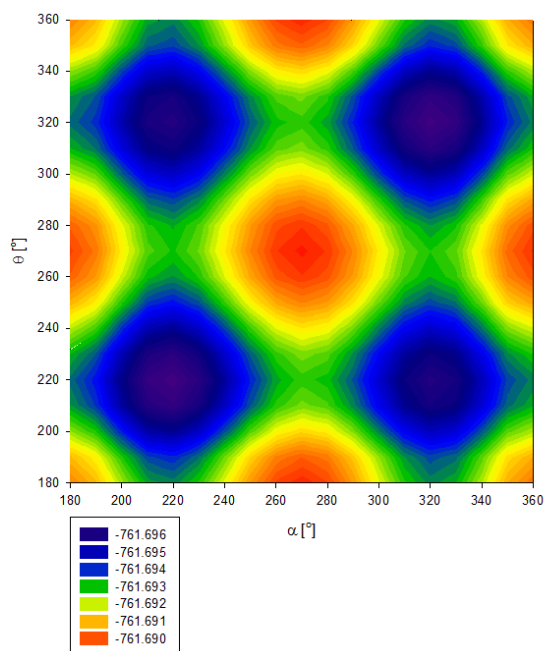
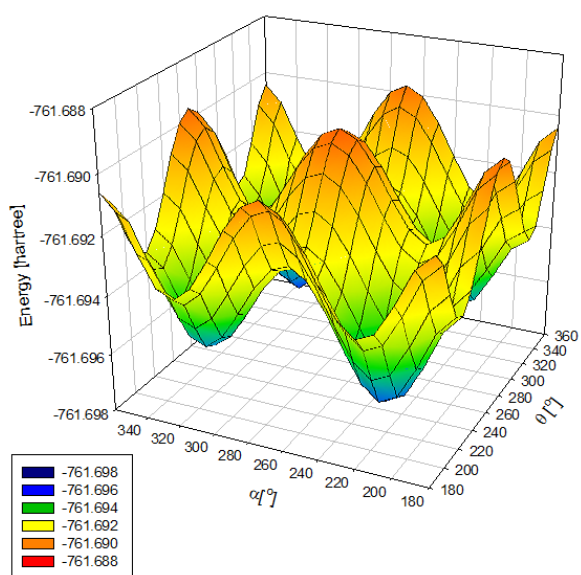
gdzie G_{term} jest termiczną poprawką do entalpii, obliczoną zgodnie ze wzorem:

$$G_{term} = H_{term} - TS_{całkowita} \quad (4.22)$$

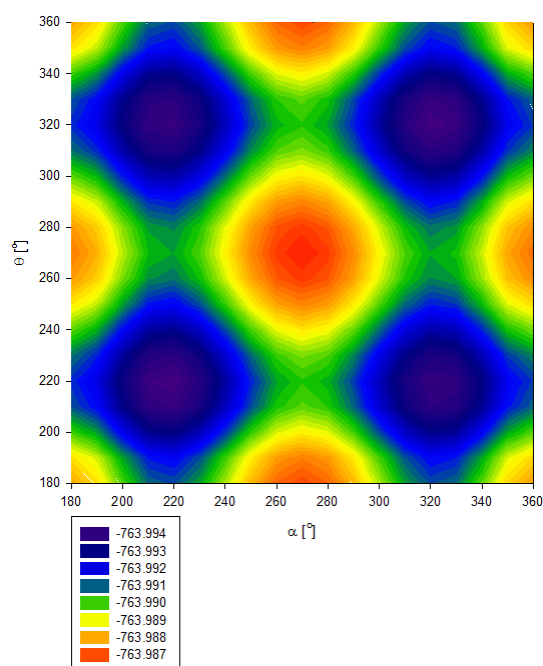
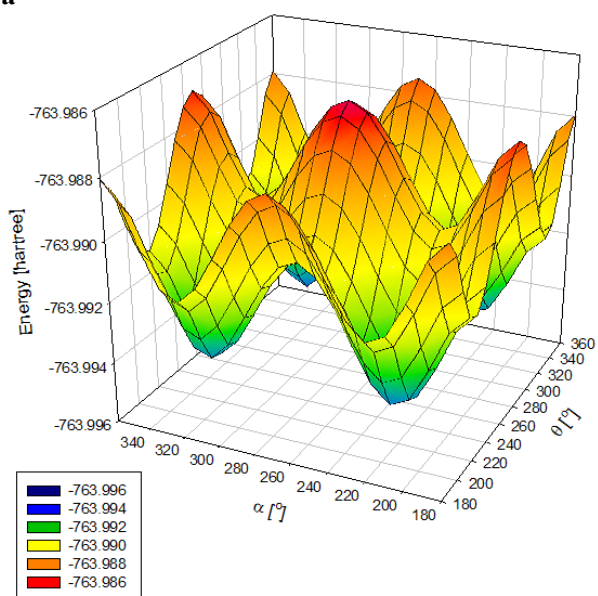
W równaniu tym $S_{całkowita}$ oznacza całkowitą entropię, będącą sumą entropii elektronowej, translacyjnej, wibracyjnej oraz rotacyjnej.

4.1. Struktura stereoizomerów resweratrolu, ich rodników tlenowych oraz anionów w próżni, medium wodnym i etanolowym

Optymalizację geometrii TR (**Rys. 1.1.1.a**) wykonano za pomocą następujących metod i baz funkcyjnych: B3LYP/6-311G(d,p), B3LYP/6-311+G(d,p), B3LYP/6-311++G(3df,2p), B3LYP/6-31G(d,p), B3LYP/6-31+G(d,p), B3LYP/aug-cc-pVDZ, B3LYP/aug-cc-pVTZ, B3LYP/aug-cc-pVQZ, B3LYP/cc-pVDZ, B3LYP/cc-pVTZ, B3LYP/cc-pVQZ, HF/6-31G(d,p), HF/6-31+G(d,p), HF/6-311G(d,p), HF/6-311+G(d,p), HF/6-311++G(3df,2p), HF/aug-cc-pVDZ, HF/aug-cc-pVTZ, HF/aug-cc-pVQZ, MP2(full)/6-31G(d,p), MP2(full)/6-31+G(d,p), MP2(full)/6-311G(d,p), MP2(full)/6-311+G(d,p), MP2(full)/6-311++G(3df,2p), MP2(full)/aug-cc-pVDZ, MP2(full)/aug-cc-pVTZ, MP2(full)/cc-pVDZ, MP2(full)/cc-pVTZ oraz MP2(full)/cc-pVQZ (**Tabela 4.1.5**). Natomiast geometrię i energię CR (**Rys. 1.1.1.b**) całkowicie zoptymalizowano na poziomach: B3LYP/6-311G(d,p), B3LYP/6-311++G(3df,2p), B3LYP/aug-cc-pVDZ, MP2(full)/6-311G(d,p), MP2(full)/6-311+G(d,p) oraz MP2(full)/aug-cc-pVDZ. Równowagowe geometrie TR i CR wyznaczono w medium wodnym oraz etanolowym, korzystając z modelu C-PCM. W celu otrzymania potencjalnych minimów energetycznych dla TR, wygenerowano PES za pomocą HF/6-31G(d) oraz MP2(full)/6-31G(d) (**Rys. 4.1.1. oraz 4.1.2.**) skanując kąty torsyjne $\alpha = C_5-C_4-C_7-C_8$ oraz $\theta = C_7-C_8-C_9-C_{10}$ w następujących zakresach: $180^\circ \leq \alpha \leq 360^\circ$, $180^\circ \leq \theta \leq 360^\circ$, $0^\circ \leq \alpha \leq 160^\circ$ oraz $180^\circ \leq \theta \leq 120^\circ$. Kąty $\alpha = C_5-C_4-C_7-C_8$ oraz $\theta = C_7-C_8-C_9-C_{10}$ opisują rotację pierścieni fenylowych wokół wiązań pojedynczych C_4-C_7 oraz C_8-C_9 połączonych z centralnym wiązaniem winylowym. Geometrie z każdego punktu otrzymanej powierzchni całkowicie zoptymalizowano za pomocą wyżej wymienionych metod bez ograniczeń na symetrię.

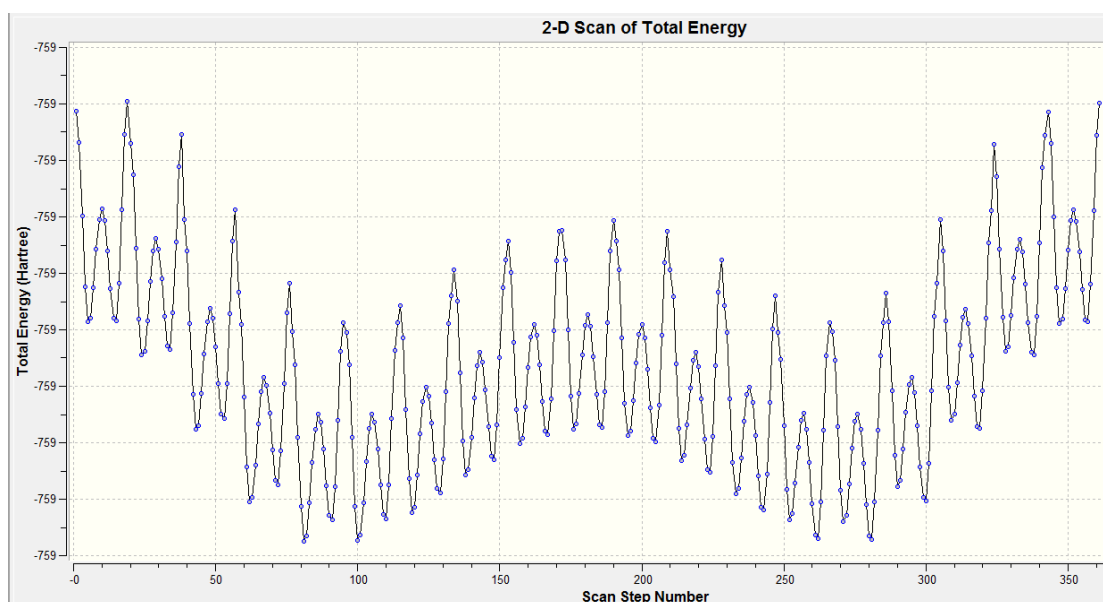


a



b

Rys. 4.1.1. 3-D-powierzchnie energii potencjalnej (PES) oraz ich 2-D profile wygenerowane za pomocą a) HF/6-31G(d) oraz b) MP2(full)/6-31G(d)

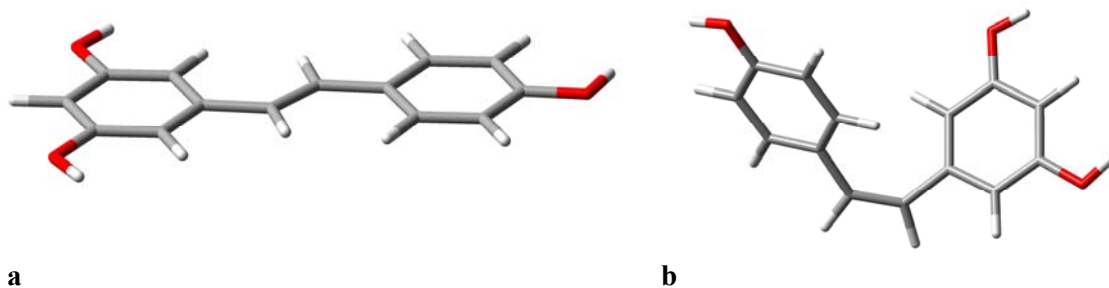


Rys. 4.1.2. Zależność całkowitej energii od numeru kroku dla TR wygenerowana w próżni za pomocą MP2(full)/6-31G(d) dla współrzędnych α i θ

Całkowicie zoptymalizowane geometrie TR oraz CR charakteryzują się brakiem częstości urojonych i znajdują się w położeniu równowagi na PES. Obliczenia wykonane przy użyciu metody DFT na poziomie B3LYP/6-311G(d,p) [187,189] oraz B3LYP/aug-cc-pVDZ pokazały na podstawie równowagowych wartości kątów torsyjnych $\alpha = C_5-C_4-C_7-C_8$ oraz $\theta = C_7-C_8-C_9-C_{10}$, że szkielet *trans*-stilbenowy w TR jest płaski (**Rys. 4.1.4.a**), w próżni, medium wodnym oraz etanolowym (**Tabela 4.1.1**). Płaska geometria TR zapewnia temu polifenolowi dużą aktywność biologiczną. W pracach Ferrer i wsp. [223] oraz Klabunde i wsp. [224] stwierdzono, że TR dzięki takiej budowie, wślizguje się między płaskie i aromatyczne biofragmenty, tworzące kanał prowadzący do centrum aktywnego syntazy chalkonowej oraz transthyretyny (TTR), która jest dimerycznym białkiem, uczestniczącym w transporcie hormonu tyroksyny. Również Basly i wsp. [219] pokazali, że TR posiadając płaską konformację, efektywnie wiąże się z receptorami estrogenowymi typu ER α i ER β . Płaska konformacja zapewnia energetycznie korzystną delokalizację układu π -elektronowego wzdłuż skoniugowanych wiązaniem winylowym pierścieni fenylowych i energetycznie preferowane oddziaływanie π - π stakingowe między cząsteczkami TR oraz płaskimi fragmentami polimeraz DNA, topoizomeraz I i II, telomeraz [216]. Należy podkreślić, że płaska geometria TR w roztworze wodnym została jednoznacznie potwierdzona przez Commodari i wsp. [218] na podstawie analizy widm NMR. Płaska konformacja TR nie znajduje natomiast swojego potwierdzenia w pracy Caruso i wsp. [152], którzy na podstawie badań dyfrakcji promieniowaniem X stwierdzili, że cząsteczka TR jest nieznacznie zgięta w kryształach. Różnice w wynikach teoretycz-

nych i eksperymentalnych są spowodowane istnieniem w kryształach oddziaływań między cząsteczkami TR, które mogą powodować deformację geometrii tego związku. Również efekt upakowania w kryształach przyczynia się do nieznacznej deformacji molekuł TR. Otrzymana na poziomie metod MP2(full)/aug-cc-pVDZ oraz MP2(full)/cc-pVQZ (**Tabela 4.1.5**) geometria szkieletu *trans*-stilbenowego TR jest w zadowalającej zgodności z wynikami Caruso i wsp. [152]. Optymalna geometria szkieletu *cis*-stilbenowego w CR, wyznaczona na poziomach B3LYP/6-311G(d,p), B3LYP/6-311++G(3df,2p) oraz B3LYP/aug-cc-pVDZ jest wyraźnie zgięta (**Rys. 4.1.4.b**). Biorąc pod uwagę fakt, że konformacja *cis* charakteryzuje się zawadą przestrzenną, zgięta struktura CR jest preferowana energetycznie. Podobnie jak w *cis*-stilbenie, oddziaływania van der Waalsa między pierścieniami fenyłowymi mogą wносить wkład do stabilizacji stereoizomeru *cis* resweratrolu [197].

W równowagowej geometrii TR, otrzymanej za pomocą metody DFT, atomy wodoru i tlenu grup OH leżą w płaszczyźnie, wyznaczonej przez pierścień fenyłowy, niezależnie od zastosowanej bazy. Taka ekwatorialna orientacja atomów wodoru i tlenu jest najbardziej korzystna energetycznie i umożliwia optymalną interakcję z wolnymi rodnikami lub grupami funkcyjnymi związków w układach biologicznych. Równowagowe wartości kątów i długości wiązań w TR pozostają w zgodności z wynikami otrzymanymi przez Caruso i wsp. [152].



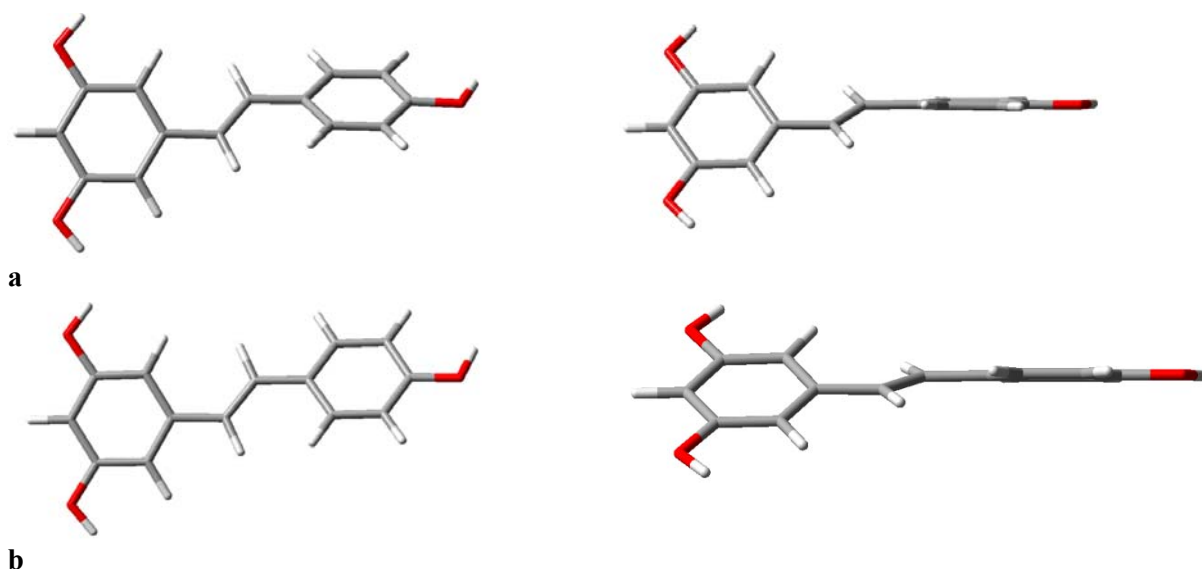
Rys. 4.1.4. Zoptymalizowane w próżni za pomocą metody B3LYP/6-311+G(d,p) równowagowe geometrie a) TR oraz b) CR

Porównując wartości energii TR oraz CR otrzymane za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) i B3LYP/6-311+G(d,p), w mediach polarnych wartość całkowitej energii jest mniejsza, niż w próżni (**Tabela 4.1.2.**). Uwzględnienie funkcji dyfuzyjnych w bazie 6-311+G(d,p) prowadzi do wzrostu stabilności energetycznej TR i CR w rozważanych środowiskach. Wartości otrzymanych energii dowodzą, że środowisko polarne bardziej stabilizuje układ molekularny w wyniku oddziaływań wodorowych i elektrostatycznych, niż próżnia. Na skutek większej polarności, woda w porównaniu z etanolem, bardziej stabilizuje cząsteczkę TR. W analizowanych mediach, TR charakteryzuje się większą stabilnością energetyczną niż izomer *cis*. Zatem, płaska struktura szkieletu *trans*-stilbenowego jest bardziej preferowana energetycznie.

Analiza równowagowych wartości długości wiązań O-H w izolowanych molekułach TR oraz CR na poziomie B3LYP/6-311++G(3df,2p) (**Tabela 4.1.3.**) pokazuje, że długości wiązań O-C, 4'-O-H, 3-O-H oraz 5-O-H są praktycznie identyczne. Sugeruje to, że grupy OH w CR i TR wykazują bardzo podobną podatność na odczepianie wodoru i protonu podczas reakcji z wolnymi rodnikami. Ponieważ nie uwzględniano w obliczeniach poprawek na anharmoniczność wiązań, ich stabilność będzie mogła być oceniona z większą dokładnością na podstawie obliczonych wartości homolitycznej entalpii dysocjacji wiązań O-H. W środowisku wodnym i etanolowym zoptymalizowane długości wiązań O-H były nieznacznie większe niż w próżni (**Tabela 4.1.1.**). To zwiększenie długości jest spowodowane elektrostatycznym oddziaływaniem TR z medium polarnym. Wniosek – w medium polarnym, w porównaniu z próżnią, wiązanie O-H jest nieco bardziej podatne na rozpad heterolityczny. Natomiast rozpad homolityczny tych wiązań nie będzie preferowany w mediach polarnych z powodu zwiększenia stabilności energetycznej TR w tych mediach. Analiza równowagowych długości wiązań O-H i O-C w TR za pomocą metod MP2(full)/6-311G(d,p) i B3LYP/6-311G(d,p) (**Tabele 4.1.1. oraz 4.1.4.**) prowadzi do wniosku, że na poziomie tych metod ich długości są praktycznie identyczne. Uzyskane wyniki wskazują, że długości wiązań O-H nie zależą od zastosowanej metody. Obserwujemy zwiększenie równowagowej długości wiązania C₇-C₈ na poziomie MP2(full)/6-311G(d,p) (1.411 Å) w porównaniu z metodą B3LYP/6-311G(d,p) (1.345 Å). Ten wynik dowodzi, że w zgiętej konformacji wiązanie to zostaje osłabione.

Dla równowagowej geometrii TR, otrzymanej w próżni za pomocą B3LYP/6-311G(d,p), harmoniczna częstość drgania torsyjnego wynosi 11,70 cm⁻¹, podczas gdy dla CR 20,27 cm⁻¹. Wynik ten dowodzi, że cząsteczka TR jest bardziej labilna konformacyjnie w temperaturze pokojowej niż CR. W środowisku wodnym i etanolowym otrzymano dla TR mniejsze wartości częstości tych drgań, równe odpowiednio: 9,23 i 9,68 cm⁻¹. Wynik ten może być skorelowany z faktem, że środowisko polarne bardziej stabilizuje układ niż próżnia. Uwzględnienie za pomocą metody MP2 większego, w porównaniu z metodą DFT, wkładu energii korelacji elektronowej do całkowitej energii, znacząco zwiększa wartość tych częstości, gdyż na poziomie MP2(full)/6-311G(d,p) częstość ta wyniosła 28,33 cm⁻¹. Labilna struktura TR, którą potwierdzają otrzymane wartości częstości powoduje, że polifenol ten nie ulega procesowi interkalacji między płaskimi szkieletami zasad azotowych DNA [216,220]. Wyniki obliczeń uzyskanych na poziomach MP2(full)/6-311G(d,p) oraz MP2(full)/aug-cc-pVDZ (**Tabela 4.1.4.**) pokazują, że geometria szkieletu *trans*-stilbenowego jest zgięta (**Rys. 4.1.5.**). Równowagowe wartości długości wiązań O-C, otrzymane za pomocą MP2(full)/aug-

cc-pVDZ są nieznacznie większe, niż otrzymane za pomocą MP2(full)/6-311G(d,p). Natomiast optymalne długości wiązań O-H na poziomie tych metod są praktycznie identyczne. Wraz ze wzrostem ilości funkcji bazowych w bazach gaussowskich, obserwujemy stopniowe zmniejszanie kątów torsyjnych α oraz θ na poziomie metod DFT, HF oraz MP2 (**Tabela 4.1.5.**). Z kolei uwzględnienie funkcji dyfuzyjnych w stosowanych bazach gaussowskich, prowadzi do nieznacznego zwiększenia wartości tych kątów. Podobnie, jak Kwasniewski i wsp.[197], zastosowano w obliczeniach MP2 bazy cc o rosnącej liczbie kardynalnej, aby sprawdzić, jak wpływa stopniowe zwiększanie ilości funkcji bazowych na geometrię TR. Na poziomie metod HF i MP2 oraz w bazach gaussowskich równowagowa geometria TR jest najbardziej zdeformowana, natomiast w złożonych bazach Dunninga, wzbogaconych w funkcje dyfuzyjne, struktura stopniowo podąża do geometrii płaskiej (**Tabela 4.1.5.**). To sugeruje, że na poziomie bogatych baz zostanie osiągnięta zgodność wyników obliczeń optymalizacyjnych, uzyskanych za pomocą trzech niezależnych metod kwantowo-mechanicznych. Otrzymany wynik może być wyjaśniony w oparciu o teorię zbieżności baz funkcyjnych w metodach kwantowo-mechanicznych. W metodach *ab initio* zbieżność jest bardzo wolna – typ wielomianowy, natomiast w metodzie DFT zbieżność jest bardzo szybka – typ eksponencjalny [190]. Stosując metodę MP2, reprodukcja wyniku otrzymanego przy zastosowaniu metody DFT i w prostej bazie jest możliwa, ale w bardzo bogatych bazach. Obliczeń w bardziej rozbudowanych bazach na poziomie metody MP2(full) nie przeprowadzono z powodu trudności z analitycznym wyznaczeniem częstości harmonicznych. W związku z tym, nie można stwierdzić, czy w bardziej złożonych bazach niż aug-cc-pVTZ otrzymamy płaską konformację TR za pomocą metody MP2. W celu rozwiązania problemu geometrii tego związku, wygenerowano PES za pomocą MP2(full)/aug-cc-pVTZ. Zidentyfikowano na tej powierzchni stan przejściowy (TS) oraz geometrie (M1 oraz M2), znajdujące się w lokalnych minimach po obu stronach TS. Zoptymalizowana geometria TS charakteryzuje się obecnością jednej częstości urojonej i posiada, podobnie jak struktura M2, zgięty szkielet *trans*-stilbenowy, natomiast geometria M1 jest idealnie płaska. Brak częstości urojonej dla geometrii M1 i M2 dowodzi, że znajdują się one w minimach lokalnych na PES. Uzyskane wyniki wskazują, że TR posiada płaski szkielet *trans*-stilbenowy na poziomie metody MP2. Natomiast bardzo mała wartość bariery rotacyjnej (0.3 kcal/mol) dla przejścia geometrii M1 w TS dowodzi, że TR jest bardzo labilny konformacyjnie.



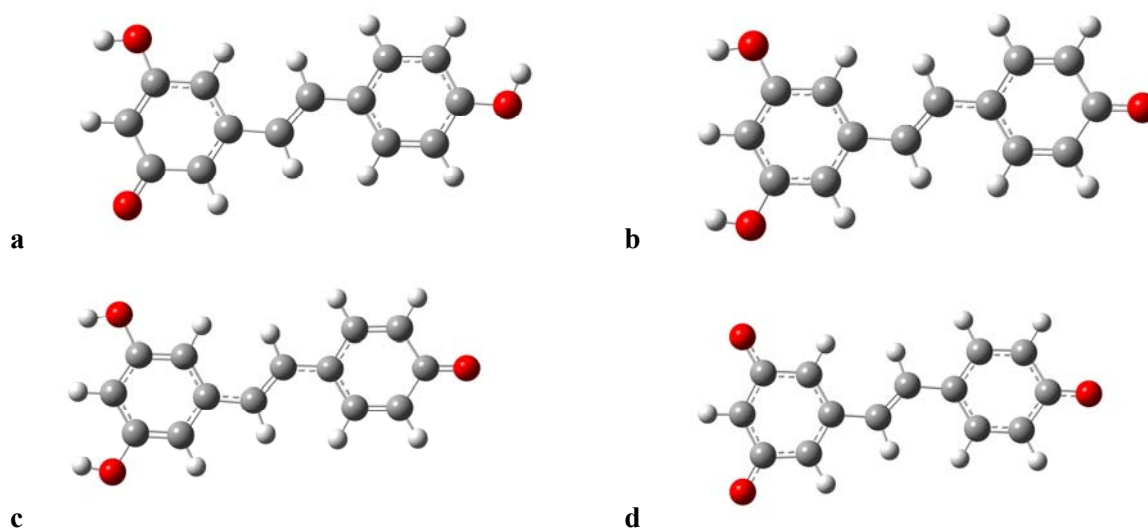
Rys. 4.1.5. Zoptymalizowane w próżni geometrie TR na poziomach: a) MP2(full)/6-311G(d,p) oraz b) MP2(full)/aug-cc-pVDZ

Otrzymana na poziomie B3LYP/6-311+G(d,p) wartość momentu dipolowego TR jest równa 3,44 D. Pokazuje to, że polifenol ten dzięki obecności grup hydroksylowych jest polarny. Otrzymane wartości momentu dipolowego są większe od momentu dipolowego wody (1,88 D), co może sugerować, że TR rozpuszcza się w wodzie. Niestety, w wielu badaniach eksperymentalnych pokazano, że TR jest w niej praktycznie nierozpuszczalny. Wskazuje to, że słaba rozpuszczalność TR jest spowodowana innymi, nieznanymi jeszcze czynnikami.

Równowagowe struktury kationorodnika TR oraz rodników fenoksyłowych otrzymane za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) oraz B3LYP/6-311+G(d,p) posiadają idealnie płaski szkielet *trans*-stilbenowy w badanych mediach. Natomiast układy otwartopowłokowe CR, podobnie jak obojętna molekula, posiadają silnie zgiętą strukturę. Równowagowe geometrie rodników fenoksyłowych mają wyraźną strukturę semichinonową (**Rys. 4.1.6.a i b**), a ich płaska geometria zapewnia korzystną energetycznie delokalizację niesparowanego elektronu wzdłuż całego szkieletu *trans*-stilbenowego. Środowisko polarne bardziej stabilizuje rodniki i kationorodnik niż próżnia. Rodnik 4'-O-fenoksyłowy TR jest trwalszy energetycznie niż pozostałe rodniki tlenowe (rodnik 3-O-fenoksyłowy oraz 5-O-fenoksyłowy) [189]. Na poziomie B3LYP/6-311G(d,p) 4'-O-rodnik jest o 4,307 kcal/mol trwalszy w próżni od 3-O-rodnika, ponieważ 4'-O-rodnik posiada większą ilość form rezonansowych, niż 3-O rodnik i dzięki temu jest bardziej stabilizowany przez rezonans. Rodniki i kationorodniki TR oraz CR są mniej stabilne niż obojętne cząsteczki (**Tabela 4.1.2.**), natomiast różnice w energiach pomiędzy próżnią, a medium polarnym są większe dla kationorodnika niż dla 4'-O-rodnika. Jest to

spowodowane silnym oddziaływaniem elektrostatycznym medium polarnego z obdarzonym ładunkiem dodatnim kationorodnikiem.

Analiza równowagowych wartości parametrów geometrycznych form anionowych na poziomie *restricted* B3LYP/6-311+G(d,p) pokazuje, że posiadają one idealnie płaski układ *trans*-stilbenowy w badanych środowiskach (**Rys. 4.1.6.c i d**). Podobnie, jak rodniki fenoksyłowe posiadają one strukturę semichinonową, stabilizowaną przez rezonans oraz obecność wiązania winylowego. Wszystkie formy anionowe są mniej trwałe, niż obojętna cząsteczka TR (**Tabela 4.1.2.**), a środowisko polarne w porównaniu z próżnią, silniej je stabilizuje [189]. Większa stabilność 4'-O-anionu niż 3-O-anionu i 5-O-anionu dowodzi, że dysocjacja heterolityczna wiązania 4'-O-H jest bardziej preferowana od dysocjacji wiązań 3-O-H i 5-O-H. Pozostaje to w zgodności z danymi eksperymentalnymi [195]. Wyniki pokazują, że 4',3-dianion jest stabilniejszy energetycznie w badanych środowiskach od 3,5-dianionu oraz w próżni. Różnica energii tych izomerycznych anionów wynosi 39,187 kcal/mol [189]. Tak duża różnica energii jest spowodowana większą stabilizacją rezonansową 4',3-dianionu, niż 3,5-dianionu. Podobnie, 4'-O-anion jest stabilniejszy energetycznie od 3-O-anionu w badanych środowiskach, ponieważ posiada więcej form rezonansowych. Różnica energii między 3-O-anionem oraz 4'-O-anionem jest większa w próżni, niż mediach polarnych, co jest efektem silnego elektrostatycznego oddziaływania medium polarnego z ujemnie naładowanymi anionami.



Rys. 4.1.6. Zoptymalizowane na poziomie B3LYP/6-311+G(d,p) geometrie a) 3-O-rodnika TR, b) 4'-O-rodnika TR, c) 4'-O-anionu TR oraz d) trianionu TR

4.2. Analiza geometryczna *trans*-piceatannolu za pomocą metod DFT oraz MP2

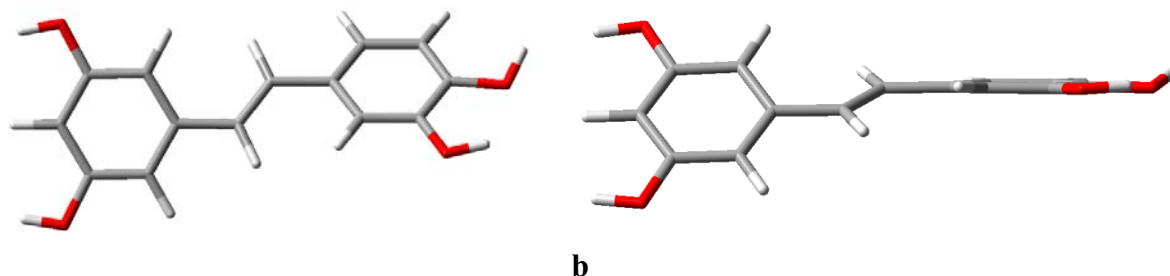
Trans-piceatannol (PC, **Rys. 1.1.1.f**) jest jednym z głównych metabolitów TR w organizmie człowieka, o większej aktywności antyoksydacyjnej niż TR. Zatem, wyznaczenie równowagowej geometrii tego związku ma kluczowe znaczenie dla znalezienia zależności struktura – aktywność biologiczna. Optymalizację geometrii i energii wykonano dla izolowanej cząsteczki PC, stosując następujące metody i bazy funkcyjne: B3LYP/6-311G(d,p), B3LYP/6-311+G(d,p), B3LYP/6-311++G(3df,2p) oraz MP2(full)/6-311G(d,p). Dla każdej całkowicie zoptymalizowanej geometrii obliczono, stosując te metody, częstości harmoniczne w celu znalezienia równowagowej geometrii na PES.

Analiza równowagowych parametrów geometrycznych (**Tabela 4.2.1.**) PC otrzymanych za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) oraz B3LYP/6-311++G(3df,2p) pokazuje, że posiada on idealnie płaski układ *trans*-stilbenowy w globalnym minimum energetycznym. Płaska geometria PC uzyskana na poziomie metody DFT znajduje swoje potwierdzenie w pracy Rossi i wsp. [196], którzy za pomocą dyfrakcji promieniowania X udowodnili, że w kryształach cząsteczka PC jest idealnie płaska, a atomy wodoru i tlenu grup hydroksylowych leżą w płaszczyźnie pierścieni fenyłowych. Na poziomach B3LYP/6-311++G(3df,2p) i B3LYP/6-311G(d,p) równowagowa geometria PC charakteryzuje się ekwatorialnym ułożeniem grup OH w płaszczyźnie, wyznaczonej przez szkielet *trans*-stilbenowy, natomiast na poziomie metody MP2(full)/6-311G(d,p) grupy OH nie wykazują tej właściwości. Równowagowe długości wiązań O-H (**Tabela 4.2.1.**) mają zbliżone wartości, natomiast zoptymalizowana długość wiązania wodorowego między atomami 4'-O oraz 5'-H wynosi 2,12 Å, co dowodzi, że wiązanie to jest stabilne. Obecność tego wewnątrzcząsteczkowego wiązania może przyczyniać się do wzrostu kwasowości protonu w grupie 3'-OH.

Równowagowe geometrie rodników fenoksyłowych, kationorodnika oraz wszystkich form anionowych, otrzymane za pomocą metody DFT, posiadają płaską, semichinonową geometrię i są mniej stabilne energetycznie niż obojętna cząsteczka PC (**Tabela 4.2.2.**). Spośród wszystkich form rodnikowych PC 4'-O-rodnik jest najtrwalszy energetycznie, gdyż posiada największą ilość form rezonansowych. Obliczenia wykonane na poziomie B3LYP/6-311+G(d,p) dla układów izolowanych pokazały, że 4'-O-rodnik jest o 14,09 kcal/mol trwalszy od 3'-O-rodnika oraz, że monoaniony, trianiony i tetraanion są mniej stabilne energetycznie, niż obojętna molekula PC.

Obliczenia wykonane za pomocą metody MP2(full)/6-311G(d,p) (**Tabela 4.2.3.**) pokazały, że PC, podobnie jak, TR posiada geometrię zgiętą w globalnym minimum energetycz-

nym na PES (**Rys. 4.2.1.**). Przeciwwstawne wyniki, otrzymane za pomocą metod DFT i MP2, nie pozwoliły na jednoznaczne wyznaczenie równowagowej geometrii PC. Stąd konieczne jest przeprowadzenie obliczeń w celu wyznaczenia rzeczywistej geometrii PC. Równowagowe wartości długości wiązań O-H oraz wiązania wodorowego między atomami O4' i H5' na poziomie metod B3LYP/6-311G(d,p) oraz MP2(full)/6-311G(d,p) są praktycznie identyczne.



Rys. 4.2.1. Zoptymalizowane w próżni na poziomie metody MP2(full)/6-311G(d,p) równowagowe geometrie PC

4.3. Bariera rotacyjna dla TR w próżni, medium wodnym oraz etanolowym

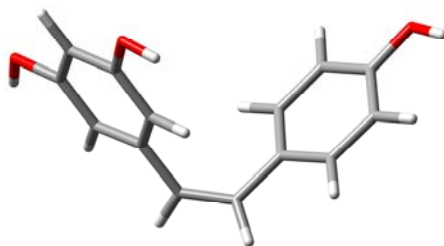
Barierę rotacyjną dla izomeryzacji TR w CR obliczono na podstawie PES, wygenerowanego za pomocą MP2(full)/6-31G(d,p). Obliczenia wykonywano na poziomie metody MP2 w celu uwzględnienia znaczącego wkładu energii korelacji elektronowej do wysokości bariery. Profil PES otrzymano dla kątów: δ ($C_9-C_8-C_7-C_4$) oraz φ ($C_4-C_7-C_8$). Współrzędne te zmieniano w zakresach: $0^\circ \leq \delta \leq 180^\circ$ i $120^\circ \leq \varphi \leq 240^\circ$. Podczas wykonywania skanu pozostałe parametry geometryczne podlegały całkowitej optymalizacji. Na otrzymanym PES zidentyfikowano minima energetyczne oraz punkty siodłowe, reprezentujące geometrię stanu przejściowego (TS).

Geometrie izolowane, odpowiadające każdemu punktowi na PES, były całkowicie zoptymalizowane za pomocą MP2(full)/6-311G(d,p), przy zafiksowanych wartościach kątów δ oraz φ , bez narzucania ograniczeń na symetrię. Równowagowe geometrie izolowanych układów były całkowicie zoptymalizowane przy użyciu MP2(full)/6-311G(d,p) i modelu C-PCM w medium wodnym i etanolowym. Dla każdej równowagowej geometrii obliczono w tych mediach energię (*single-point energy*), stosując następujące metody: MP2(full)/aug-cc-pVDZ, MP2(full)/aug-cc-pVTZ, MP2(full)/aug-cc-pVQZ oraz MP4/6-311G(d,p). W ten sposób wyznaczono dokładniejsze wartości barier rotacyjnych w bogatych bazach funkcyjnych, z uwzględnieniem dużego wkładu korelacji elektronowej, pochodzącego od metod MP2 i MP4.

Zidentyfikowano na PES minima energetyczne odpowiadające geometrii CR oraz TR. Geometria odpowiadająca punktowi siodłowemu na PES charakteryzowała się obecnością jednej częstości urojonej, co dowodzi, że reprezentowała stan przejściowy. Na **Rys. 4.3.1.**

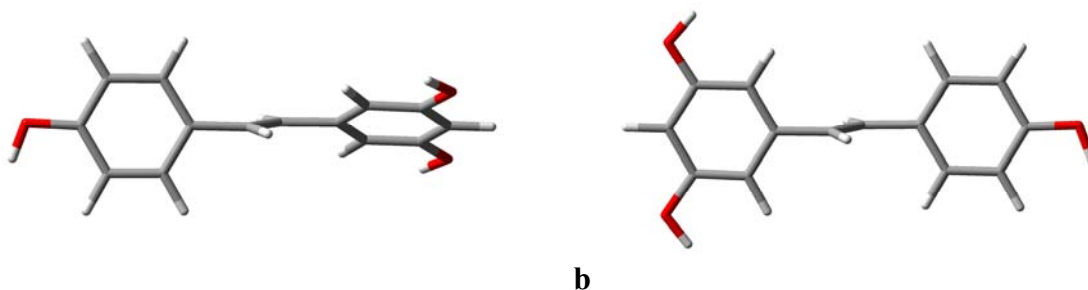
przedstawiono zoptymalizowaną geometrię stanu przejściowego. Na PES znaleziono tylko jedną geometrię odpowiadającą TS, co potwierdziła analiza częstości. Struktura ta posiada wyraźnie zgięty szkielet *trans*-stilbenowy, gdyż charakteryzuje się on następującymi wartościami kątów torsyjnych: α ($C_5-C_4-C_7-C_8$) = $25,47^\circ$ oraz θ ($C_7-C_8-C_9-C_{10}$) = $28,18^\circ$, a także δ ($C_9-C_8-C_7-C_4$) = $60,03^\circ$.

Na podstawie otrzymanych wartości barier energetycznych (**Tabela 4.3.1.**) można stwierdzić, że wraz ze wzrostem ilości funkcji bazowych użytych w obliczeniach, wysokość bariery maleje. Obserwujemy zwiększenie jej wysokości na poziomie MP4(full)/6-311G(d,p) w stosunku do wartości otrzymanej za pomocą MP2(full)/6-311G(d,p). Zmniejszenie wartości energii elektronowej TR, CR oraz stanu przejściowego w czwartym rzędzie rachunku zaburzeń, prowadzi do podwyższenia wysokości bariery. Wysokości bariery rotacyjnej obliczone za pomocą MP4/6-311G(d,p) w próżni, medium wodnym oraz etanolowym wynosiły odpowiednio 9,05, 10,23 oraz 9,15 kcal/mol. Media polarne zwiększają wartość tej bariery, co możemy wytłumaczyć zwiększeniem trwałości energetycznej TR w tych mediach. Otrzymane bariery rotacyjne przyjmują bardzo małe wartości w badanych mediach, co dowodzi, że TR jest w nich labilny torsyjnie i izomeryzacja *trans-cis* będzie bardzo łatwo indukowana promieniowaniem UV. Bariera termiczna dla przejścia izomeru *trans* w *cis* może być bardzo mała i, w efekcie, izomeryzacja TR w CR może zachodzić już nawet w temperaturze pokojowej. Należy wnioskować, że TR będzie trwałe tylko w niskich temperaturach. Bardzo małe wartości bariery rotacyjnej są najprawdopodobniej spowodowane połączeniem pierścieni fenylowych za pomocą wiązania winylowego, którego wiążąca para π na skutek tego sprzężenia ulega silnej delokalizacji. Obliczone za pomocą MP2(full)/6-311G(d,p) wartości entalpii izomeryzacji TR-CR i entalpii swobodnej Gibbsa równe odpowiednio: 2,11 kcal/mol i 2,24 kcal/mol pozwalają wnioskować, że proces ten jest endoenergetyczny i nie jest samorzutny termodynamicznie. To dowodzi, że reakcja izomeryzacji może zachodzić pod wpływem bodźców zewnętrznych, takich jak temperatura oraz promieniowanie UV. Z uwagi na to, kolejnym etapem badań teoretycznych będzie obliczenie wysokości bariery rotacyjnej dla TR, znajdującego się we wzbudzonym pierwszym stanie trypletowym oraz w innych, niż standardowe warunkach.



Rys. 4.3.1. Zoptymalizowana geometria TS za pomocą metody MP2(full)/6-311G(d,p)

Obliczono również bariery energetyczne dla izomeryzacji płaskiej geometrii TR, zoptymalizowanej za pomocą metody MP2(full)/6-311G(d,p) w struktury posiadające dwa i jeden pierścień fenylowy, obrócony o 90° względem płaszczyzny, wyznaczonej przez wiązanie winylowe (**Rys. 4.3.2.**). Geometrie zoptymalizowane w próżni, posiadające takie ułożenie pierścieni fenylowych, całkowicie zoptymalizowano na poziomie MP2(full)/6-311G(d,p), przy zafiksowanych wartościach kątów torsyjnych α ($C_5-C_4-C_7-C_8$) oraz θ ($C_7-C_8-C_9-C_{10}$), które były równe 0° lub 90° . Równowagowe geometrie izolowanych układów, następnie całkowicie zoptymalizowano w medium wodnym i etanolowym za pomocą MP2(full)/6-311G(d,p). Dla każdej zoptymalizowanej geometrii obliczono w rozważanych mediach energię (*single-point energy*) na następujących poziomach: MP2(full)/aug-cc-pVDZ, MP2(full)/aug-cc-pVTZ, MP2(full)/aug-cc-pVQZ oraz MP4/6-311G(d,p).



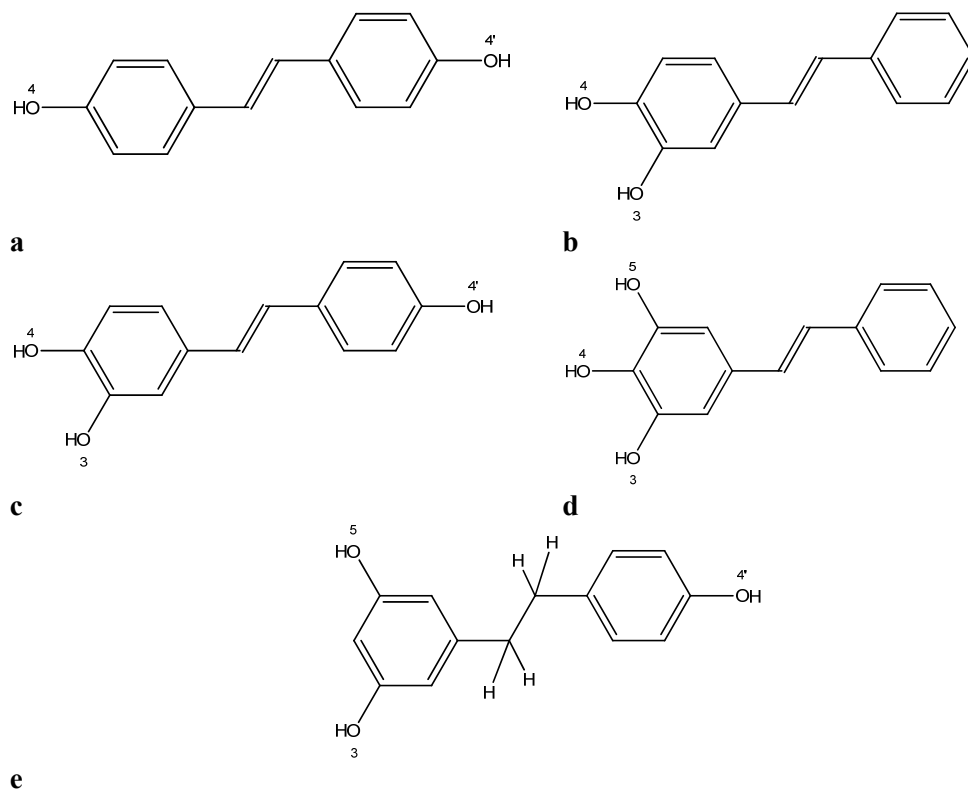
Rys. 4.3.2. Geometrie TR posiadające a) jeden pierścień fenylowy obrócony o 90° oraz b) dwa pierścienie fenylowe obrócone o 90°

Największa ilość energii jest niezbędna do przejścia TR w formę posiadającą dwa pierścienie obrócone o 90° (**Tabela 4.3.2.**). Geometria ta charakteryzuje się obecnością jednej częstości urojonej i, tym samym, reprezentuje stan przejściowy na PES. Wiązania C8-C9 i C4-C7 w tej strukturze są średnio o $0,021 \text{ \AA}$ dłuższe od tych wiązań w równowagowej i płaskiej geometrii TR. Natomiast centralne wiązanie winylowe C7-C8 ulega skróceniu o $0,09 \text{ \AA}$ w stosunku do długości tego wiązania w równowagowej geometrii. Uzyskany wynik dowodzi, że podczas rotacji pierścieni fenylowych π - π koniugacja między nimi zostaje osłabiona. Podobny rezultat otrzymano dla przejścia konformacji płaskiej *trans*-stilbenu w ortogonalną,

posiadającą dwa pierścienie fenyłowe obrócone o 90° [197]. Należy podkreślić, że ta ortogonalna geometria TR, ułatwia jego wiązanie z mitochondrialną F1 ATP-azą oraz białkiem ludzkiego osocza HAS [217]. Bariera dla rotacji jednego pierścienia fenyłowego o 90° w *trans*-stilbenie obliczona przez Kwasniewskiego i wsp. [197] wyniosła 5,07 kcal/mol na poziomie B3LYP/cc-pVDZ, 3,15 kcal/mol na poziomie HF/cc-pVDZ oraz 3,80 kcal/mol na poziomie MP2(full)/cc-pVDZ. Natomiast na poziomach B3LYP/cc-pVTZ oraz B3LYP/cc-pVQZ otrzymano wartości: 4,83 kcal/mol oraz 4,33 kcal/mol. Dla rotacji o 90° dwóch pierścieni fenyłowych otrzymano za pomocą metod B3LYP/cc-pVDZ, B3LYP/cc-pVTZ oraz B3LYP/cc-pVTZ następujące wartości barier: 9,35 kcal/mol, 8,90 kcal/mol oraz B3LYP/cc-pVQZ. Wyniki te oznaczają, że TR, podobnie jak *trans*-stilben, jest bardzo podatny na drgania torsyjne pierścieni fenyłowych, względem wiązania winylowego. Porównując wysokość bariery dla rotacji jednego pierścienia o 90° , otrzymaną na poziomie MP2(full)/cc-pVDZ dla *trans*-stilbenu oraz na poziomie MP2(full)/aug-cc-pVDZ dla TR widzimy, że dla TR bariera ta jest wyższa. Większe wartości wspomnianych barier dla TR, niż dla *trans*-stilbenu są wynikiem stabilizującego wpływu wiązań wodorowych, istniejących między grupami OH w TR. Również Caruso i wsp [152] za pomocą funkcjonału Perdew i Wanga oraz bazy DNP wykazali, że energia dla ortogonalnej struktury TR jest o 7,3 kcal/mol wyższa, od energii TR w konformacji płaskiej. Rozbieżność tego wyniku i wyniku uzyskanego w niniejszej rozprawie spowodowana jest zastosowaniem odmiennych metody kwantowo-mechanicznych i baz funkcyjnych. Porównując wartości barier w różnych bazach funkcyjnych widzimy, że w bazach Dunninga wysokość bariery jest wyższa, od obliczonej w bazie gaussowskiej 6-311G(d,p). Większy wkład korelacji elektronowej uzyskany za pomocą metody MP2 w powiązaniu z bazami Dunninga przyczynia się do wzrostu wysokości bariery. Obliczenia wykonane przy wykorzystaniu metod MP2 oraz MP4 pokazują, że bariery dla rotacji pierścieni fenyłowych o 90° mają większe wartości na poziomie metody MP4 niż MP2. Wartość bariery rotacyjnej w medium wodnym dla przejścia TR w formę z dwoma pierścieniami obróconymi o 90° oraz w formę z jednym pierścieniem fenyłowym, obróconym o ten kąt, jest wyższa w porównaniu z próżnią (**Tabele 4.3.2 i 4.3.3**). Wynik ten oznacza, że medium wodne bardziej stabilizuje układ, niż próżnia.

4.4. Analiza geometryczna i energetyczna hydroksylowych pochodnych TR i CR oraz ich rodników i kationorodników

Wyznaczono równowagową geometrię następujących pochodnych resweratrolu: *trans*-4,4'-dihydroksystilbenu (*trans*-4,4'-DHS), *trans*-3,4-dihydroksystilbenu (*trans*-3,4-DHS), *trans*-3,4,4'-trihydroksystilbenu (*trans*-3,4,4'-THS), *trans*-3,4,5-trihydroksystilbenu (*trans*-3,4,5-THS) oraz α,β -dihydro-3,4',5-trihydroksystilbenu (α,β -dihydro-3,4',5-THS) (**Rys. 4.4.1.**). W celu wyznaczenia entalpii izomeryzacji *trans-cis* optymalizowano także geometrię i energię stereoizomerów *cis*. W obliczeniach zastosowano funkcjonal hybrydowy B3LYP oraz bazę funkcyjną 6-311G(d,p). Równowagowe geometrie izolowanych układów, były optymalizowane w medium wodnym. Analiza częstości harmoniczných pokazała, że wszystkie zoptymalizowane geometrie obojętnych stereoizomerów, ich form rodnikowych oraz kationorodnikowych, znajdują się w położeniach równowagi na PES.



Rys. 4.4.1. Pochodne hydroksylowe TR: a) *trans*-4,4'-dihydroksystilben (*trans*-4,4'-DHS), b) *trans*-3,4-dihydroksystilben (*trans*-3,4-DHS), c) *trans*-3,4,4'-trihydroksystilben (*trans*-3,4,4'-THS), d) *trans*-3,4,5-trihydroksystilben (*trans*-3,4,5-THS) oraz e) α,β -dihydro-3,4',5-trihydroksystilben (α,β -dihydro-3,4',5-THS)

Wszystkie izolowane geometrie stereoizomerów *cis*, ich rodników fenoksylowych oraz kationorodników, charakteryzują się mniejszą stabilnością energetyczną, niż stereoizomery *trans*, ich rodniki fenoksyłowe oraz kationorodniki (**Tabela 4.4.1.**). W medium wodnym

wszystkie zoptymalizowane struktury są bardziej stabilne, niż w próżni (**Tabela 4.4.2**). Otrzymane wartości entalpii izomeryzacji *trans-cis* są większe w medium wodnym, co może być związane z większą stabilizacją energetyczną badanych stereoizomerów w tym medium (**Tabela 4.4.3**), spowodowaną silnymi oddziaływaniami elektrostatycznymi między substancją rozpuszczoną, a cząsteczkami rozpuszczalnika. Małe wartości tych entalpii pokazują, że stereoizomery *trans* bardzo łatwo mogą przekształcać się w izomery *cis*. Różnica energii między najbardziej stabilnym izomerem *cis* i *trans* jest mniejsza, niż w przypadku odpowiednich rodników fenoksyloowych. [187]. Duża wartość entalpii izomeryzacji dla molekuly *trans*-3,4,5-THS może być związana z geometrią stereoizomeru *trans*, która w globalnym minimum energetycznym charakteryzuje się następującymi wartościami kątów torsyjnych: α ($C_5-C_4-C_7-C_8$) = $6,98^\circ$, θ ($C_7-C_8-C_9-C_{10}$) = $6,97^\circ$. Wartości te dowodzą, że szkielet *trans*-stilbenowy w tym związku wykazuje odchylenie od płaskiej struktury, z powodu silnych oddziaływań wodorowych pomiędzy blisko położonymi grupami OH. Równowagowa długość wiązania wodorowego w tej cząsteczce między atomem tlenu grupy 5-OH oraz wodoru grupy 4-OH wynosi $1,67 \text{ \AA}$, co dowodzi, że wiązanie to jest silne. Entalpie izomeryzacji dla obojętnych cząsteczek są mniejsze niż dla rodników fenoksyloowych (**Tabela 4.4.3**). Dowodzi to, że izomeryzacja *trans-cis* dla rodników wymaga dostarczenia większej energii niż w przypadku obojętnych cząsteczek.

Równowagowe wartości długości wiązania C=C w badanych związkach oraz ich rodnikach fenoksyloowych są porównywalne (**Tabela 4.4.1**) [187]. We wszystkich izolowanych związkach równowagowe długości wiązań O-H są praktycznie identyczne. Dowodzi to, że na podstawie długości tych wiązań, nie można wnioskować o aktywności antyoksydacyjnej badanych związków. W medium wodnym obserwujemy zwiększenie długości wiązań O-H w badanych związkach oraz ich 4'-O-rodnikach fenoksyloowych (**Tabela 4.4.2**). Wynik ten oznacza, że medium wodne zmniejsza trwałość wiązania O-H i, w efekcie, jest ono w nim bardziej podatne na rozpad heterolityczny (dysocjację jonową).

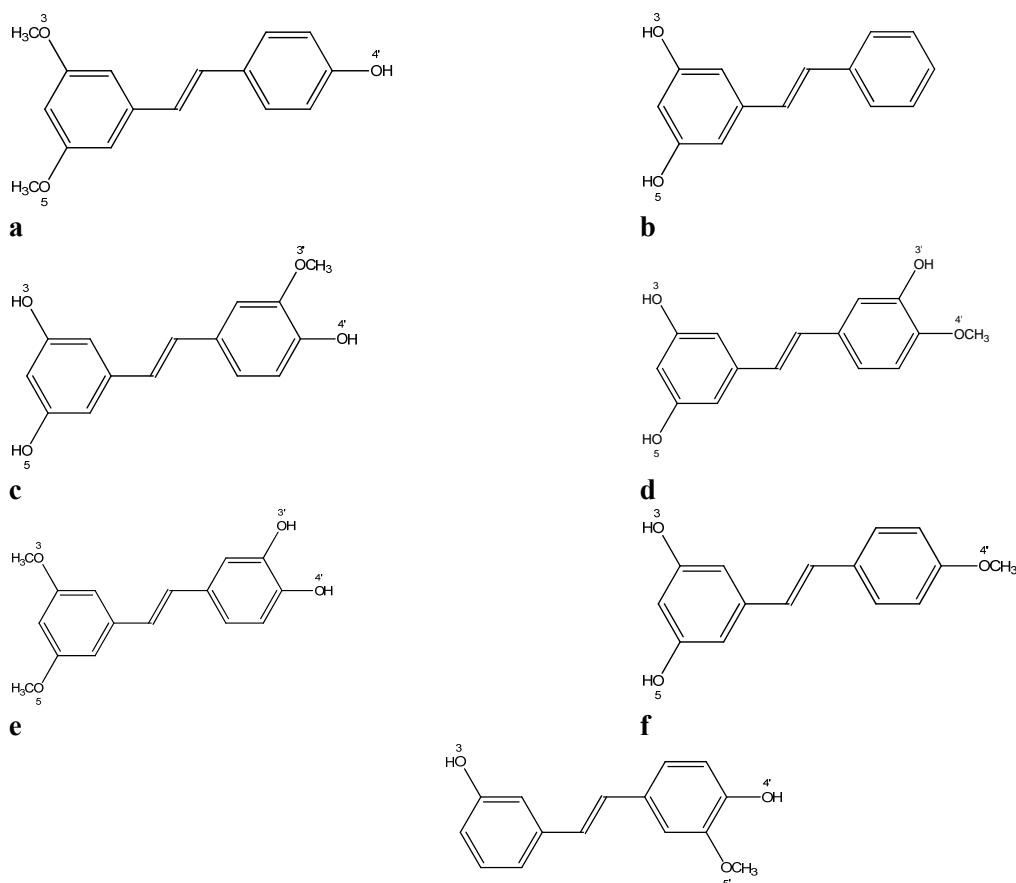
Równowagowe wartości kątów torsyjnych: β ($C_6-C_1-O_4-H_4$), γ ($C_{10}-C_{11}-O_5-H_5$), φ ($C_{14}-C_{13}-O_3-H_3$) oraz δ ($C_{11}-C_{12}-O_4-H_4$) dowodzą, że atomy wodoru oraz tlenu wszystkich grup hydroksyloowych leżą w płaszczyźnie pierścieni fenylowych [187]. Równowagowe wartości kątów torsyjnych α ($C_5-C_4-C_7-C_8$) oraz θ ($C_7-C_8-C_9-C_{10}$) w obojętnych molekułach o konfiguracji *trans* za wyjątkiem 3,4,5-THS, ich rodnikach oraz kationorodnikach są równe około 0° w badanych środowiskach. W badanych środowiskach struktury *cis*-stereoizomerów, ich rodników oraz kationorodników wykazują duże odchylenie od płaskiej geometrii. Naj-

prawdopodobniej taka geometria stereoizomerów *cis* powoduje, że mają one wyższą energię, niż stereoizomery *trans* (**Tabela 4.4.3**). W badanych środowiskach rodniki fenoksyłowe zarówno stereoizomerów *trans*, jak i *cis*, posiadają strukturę semichinonową stabilizowaną przez wiązanie winylowe.

4.5. Struktura hydroksylowych i metoksyłowych pochodnych TR

Biorąc pod uwagę fakt, że badane substancje (pterostilbenu, pinosylwiny, rapontygeniny, izorapontygeniny, hydropterostilbenu, deoksyrapontygeniny oraz pinostilbenu) (**Rys. 4.5.1.**) wykazują dużą aktywność biologiczną, poznanie ich równowagowej geometrii jest ważnym elementem, w wyjaśnieniu zależności struktura – funkcja biologiczna. W obliczeniach zastosowano następujące metody i bazy funkcyjne: MP2(full)/6-311G(d,p), B3LYP/6-311G(d,p), B3LYP/6-311++G(3df,2p) oraz HF/6-311G(d,p). Za pomocą tych metod, dla zoptymalizowanych geometrii, wyznaczono częstości drgań harmonicznych.

Zoptymalizowana geometria każdego polifenolu znajduje się w położeniu równowagi na PES. Wyniki otrzymane na poziomach B3LYP/6-311G(d,p) oraz B3LYP/6-311++G(3df,2p) dowodzą, że wszystkie atomy wodoru i tlenu grup hydroksylowych leżą w płaszczyźnie pierścieni fenyłowych, natomiast równowagowe wartości długości wiązań O-H w izolowanych związkach są praktycznie identyczne (**Tabela 4.5.1.**). W związku z tym, nie można wnioskować o różnicy trwałości tych wiązań na podstawie ich długości. Dopiero obliczone wartości entalpii dysocjacji homolitycznej tych wiązań pozwolą na porównanie ich podatności na rozpad homolityczny. Równowagowe geometrie badanych związków otrzymane za pomocą metod B3LYP/6-311G(d,p) oraz B3LYP/6-311++G(3df,2p) posiadają płaski szkielet *trans*-stilbenowy (**Tabela 4.5.2.**). Tylko struktura pterostilbenu, zoptymalizowana przy użyciu B3LYP/6-311G(d,p), charakteryzuje się nieznacznie zgiętym szkieletem *trans*-stilbenowym. Uzyskane na poziomie B3LYP/6-311G(d,p) wartości częstości drgań torsyjnych (rzędu 10 cm^{-1}) pierścieni fenyłowych wokół pojedynczego wiązania, połączonego z wiązaniem winylowym dowodzą, że wszystkie badane pochodne metoksyłowe i hydroksyłowe są bardzo labilne torsyjnie.



Rys. 4.5.1. Pochodne metoksyłowe i hydroksylowe TR i PC: a) pterostilben, b) pinosylwina, c) rapontygenina, d) izorapontygenina, e) hydropterostilben, f) deoksyrapontygenina, g) pino-stilben

Obliczenia dla układów w obecności medium wodnego, wykonano za pomocą modelu C-PCM i metod B3LYP/6-311G(d,p) oraz B3LYP/6-311++G(3df,2p). Wszystkie badane związki posiadają w medium wodnym idealnie płaski szkielet *trans*-stilbenowy i charakteryzują się większą trwałością energetyczną w tym medium, niż w próżni. Długości wiązań O-H w medium wodnym są dłuższe, niż w próżni (**Tabela 4.5.1.**), co dowodzi, że w wodzie są one bardziej podatne na rozpad heterolityczny.

Wszystkie badane związki posiadają wyraźnie zgiętą geometrię szkieletu *trans*-stilbenowego na poziomie metod MP2 i HF (**Tabela 4.5.2.**). Zoptymalizowana przy użyciu metody MP2 geometria jest bardziej zgięta, niż otrzymana za pomocą metody HF. Wynik ten oznacza, że efekty korelacji elektronowej powodują, że struktura związków nie jest płaska. Ponadto na poziomie metody MP2(full) atomy grup OH we wszystkich związkach nie leżą w płaszczyznach wyznaczonych przez pierścienie fenylowe. Kolejne obliczenia zostaną wykonane w celu wyznaczenia równowagowej geometrii badanych polifenoli, gdyż uzyskano rozbieżne wyniki na poziomie metod DFT, MP2 oraz HF.

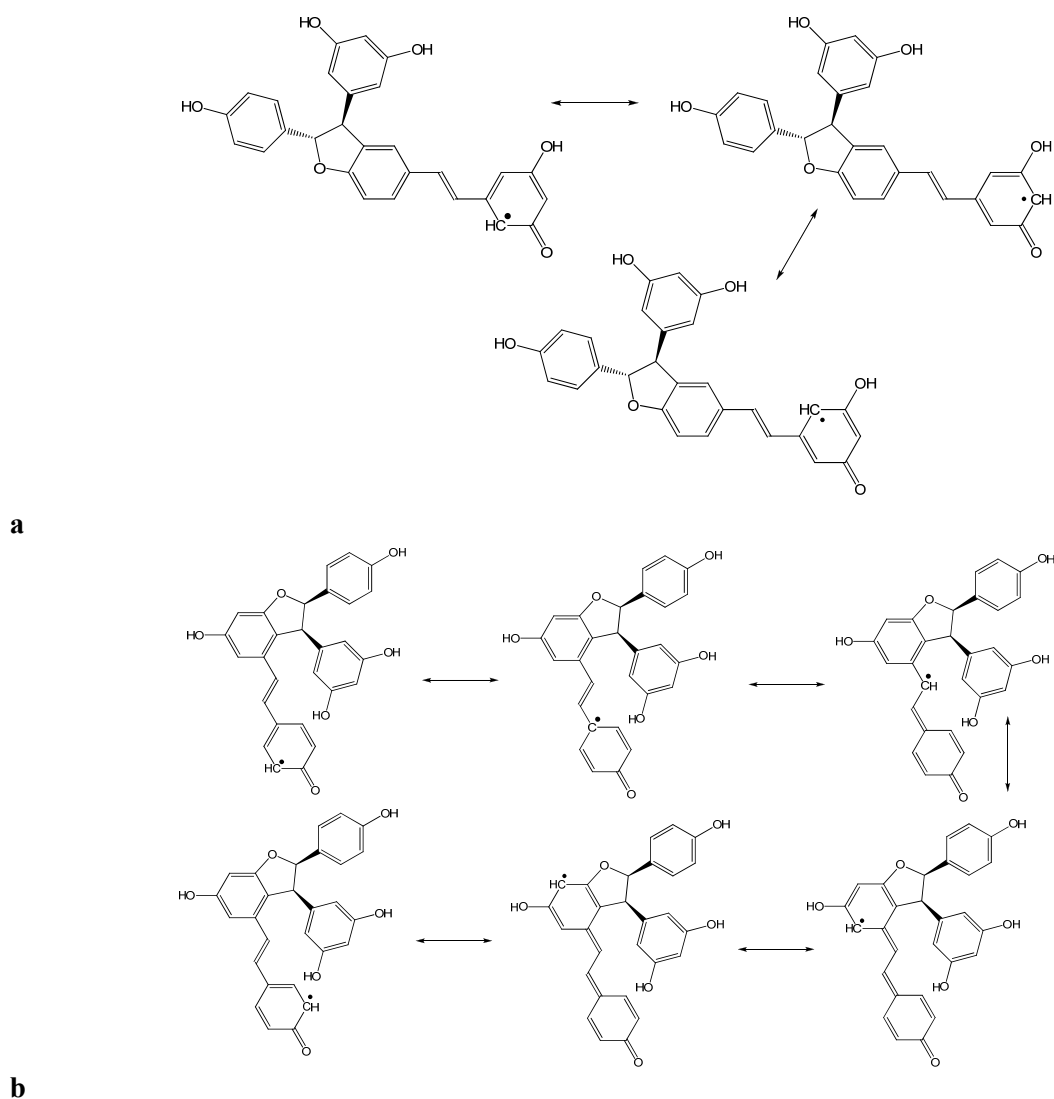
Obliczenia wykonane na poziomie MP2(full)/6-311G(d,p) pokazały nieznaczne różnice w geometrii szkieletu *trans*-stilbenowego badanych polifenoli. Zarówno w próżni, jak i w medium wodnym jest on zgięty, przy czym w medium wodnym obserwujemy nieznaczne zmniejszenie wartości kątów torsyjnych α (C₅-C₄-C₇-C₈) oraz θ (C₇-C₈-C₉-C₁₀) w porównaniu z próżnią. Uzyskane wyniki dowodzą, że równowagowa geometria tych związków jest zależna od zastosowanej metody kwantowo-mechanicznej. W przypadku zgiętego szkieletu *trans*-stilbenowego następuje zmniejszenie długości wiązań O-H. Różnice w długości wiązań O-H w geometrii płaskiej i zgiętej pochodnych hydroksylowych resweratrolu należy tłumaczyć zastosowaniem różnych metod (DFT oraz MP2).

4.6. Struktura oligomerów, glukozydów, siarczanów(VI) TR oraz ich rodników tlenowych

Obliczenia wykonano na poziomie metody B3LYP/6-311G(d,p) dla układów izolowanych i w obecności medium wodnego, za pomocą modelu solwatacyjnego C-PCM. Zoptymalizowano parametry geometryczne następujących oligomerów TR: stereoizomerów *trans*- δ -winiferyny, *trans*- ϵ -winiferyny, gnetiny H, pallidolu, trimeru TR-suffruticosolu B zwanego inaczej α -winiferyną (**Rys. 1.1.2.e**) oraz dimeru *trans*-4,4'-dihydroksystilbenu (dimer *trans*-4,4'-DHS, **Rys. 4.4.1.a**). Ten ostatni powstaje w wyniku oksydacyjnej dimeryzacji rodnika tlenowego *trans*-4,4'-DHS w obecności jonów Cu²⁺ [198]. Obliczenia optymalizacyjne zastosowano również dla glukozydów (*trans*-piceidu, *cis*-piceidu (**Rys. 1.1.1.c i d**), *trans*-astringiny (**Rys. 1.1.3.a**), TR-4'-O- β -glukopiranozydu (**Rys. 1.1.3.b**), siarczanów(VI) (**Rys. 4.6.3**), 3-O-glukuronianu TR (**Rys. 1.1.3.c**). Badano wpływ obecności pierścienia dihydrofuranowego, szkieletu bicyklo[3.3.0]oktanowego, cykloheptanowego, cyklopentanowego na trwałość energetyczną i wartości pozostałych parametrów geometrycznych izomerów winiferyny, gnetiny H, pallidolu oraz α -winiferyny. Ponadto, zbadano geometrię stereoizomerów optycznych δ -winiferyny, pallidolu (**Rys. 1.1.2.c i 1.1.2.f**). Obliczenia przeprowadzono dla glukozydów, zawierających wiązanie β -O-glikozydowe, gdyż β -anomery charakteryzują się największą trwałością termodynamiczną. W celu porównania stabilności energetycznej rodników fenoksylowych, zoptymalizowano geometrię i energię 4-O-rodnika *trans*- ϵ -winiferyny, 4'-O-rodnika *trans*-piceidu oraz 3-O-rodnika *trans*- δ -winiferyny-A (**Rys. 4.6.1 i 4.6.2.**), stosując metodę B3LYP/6-311G(d,p).

W równowagowych geometriach badanych związków, atomy wodoru i tlenu wszystkich grup hydroksylowych leżą w płaszczyźnie pierścieni fenylowych. Równowagowe długo-

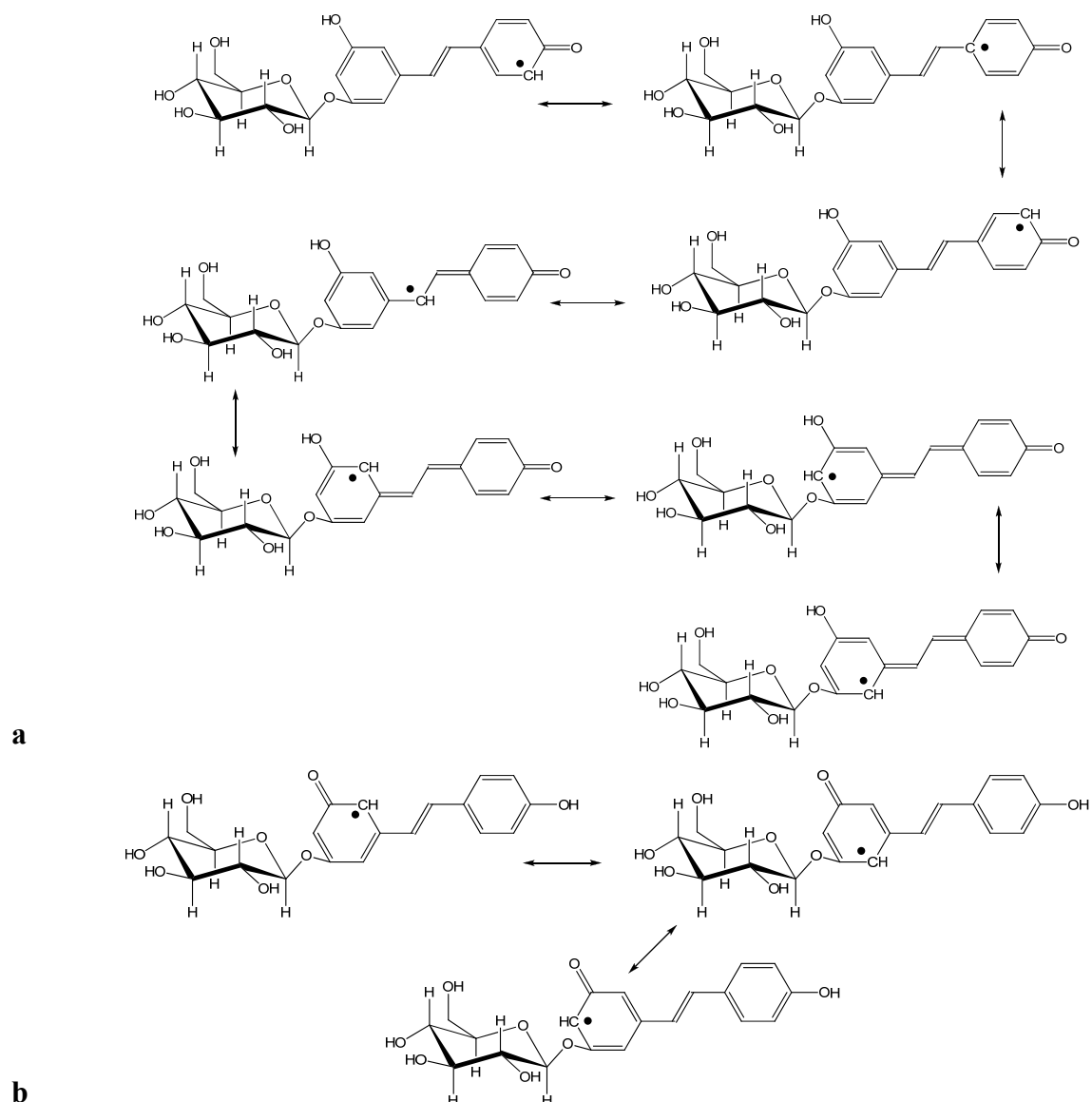
ści wiązań O-H w izolowanych cząsteczkach mają bardzo zbliżoną długość (**Tabela 4.6.1.**). Stąd charakteryzują się one podobną trwałością [188]. Dokładna ocena podatności wiązań O-H na rozpad homolityczny zostanie dokonana na podstawie wartości entalpii ich dysocjacji.



Rys. 4.6.1. Struktury rezonansowe rodników fenoksyłowych oligomerów TR a) 3-O-rodnika *trans*-δ-winiferyny-A oraz b) 4-O-rodnika *trans*-ε-winiferyny

Szkielet *trans*-stilbenowy w dimerze *trans*-4,4'-DHS, gnetinie H oraz *trans*-ε-winiferynie jest zgięty (**Tabela 4.6.2.**) [188]. Natomiast w równowagowych geometriach stereoizomerów *trans*-δ-winiferyny, glukozydów oraz 3-O-glukuronianu szkielet *trans*-stilbenowy jest praktycznie płaski. Ponadto, w *trans*-δ-winiferynie B szkielet *trans*-stilbenowy charakteryzuje się mniejszym odchyleniem od geometrii zgiętej niż w *trans*-δ-winiferynie A. W środowisku wodnym wszystkie stereoizomery *trans* charakteryzują się płaską geometrią szkieletu stilbenowego. W związku z tym, w medium wodnym, aktywność biologiczna badanych związków powinna być większa niż w mediach niepolarnych. Analiza

równowagowej geometrii pallidolu pokazała, że szkielet bicyklo[3.3.0]oktanowy jest wyraźnie zgięty w badanych środowiskach [188]. Zoptymalizowane wartości kątów torsyjnych $C_{14}-C_{15}-C_{16}=114,41^\circ$ oraz $C_{7}-C_{29}-C_{28}=115,45^\circ$ potwierdzają ten wynik. Równowagowe długości wiązań O-H w cząsteczce pallidolu charakteryzują się podobnymi wartościami, co można uzasadnić wysoką symetrią tej molekuly. W α -winiferynie, zarówno szkielet cyklopentanowy, jak i cykloheptanowy, a także związane z nim pierścienie fenyłowe znajdują się w jednej płaszczyźnie. W porównaniu z pallidolem, nie obserwujemy deformacji szkieletu cykloheptanowego i cyklopentanowego. Natomiast, podobnie jak w pallidolu, równowagowe długości wiązań O-H są praktycznie identyczne (**Tabela 4.6.1**).



Rys. 4.6.2. Struktury rezonansowe a) 4'-O- oraz b) 5-O-rodnika *trans*-piceidu

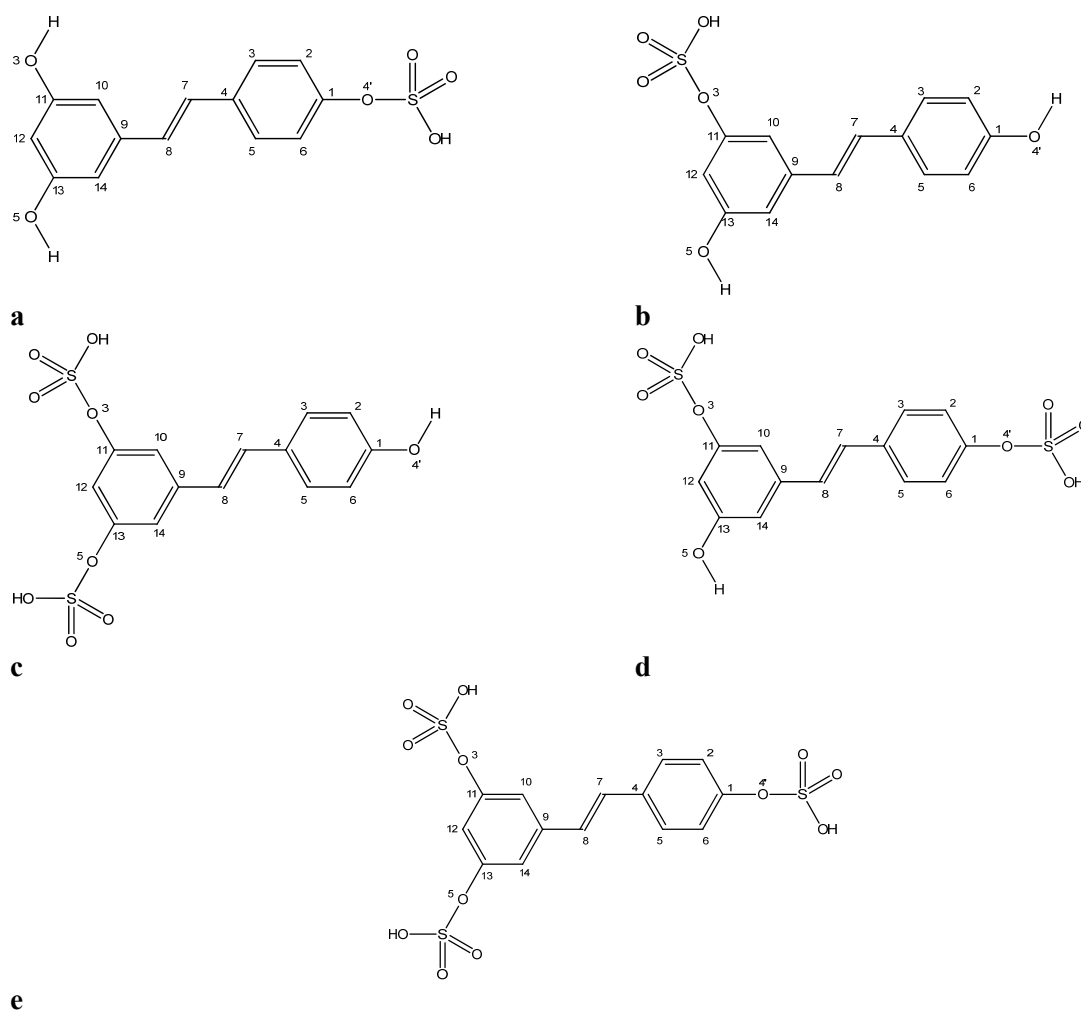
Całkowicie zoptymalizowane geometrie rodniców fenoksylowych badanych związków posiadają strukturę semichinonową [188]. Analiza energetyczna sugeruje, że obecność pierścienia dihydrofuranowego zwiększa trwałość energetyczną gnetyny H oraz jej rodniców tlenowych. Wszystkie badane rodniki oraz kationorodniki w próżni i medium wodnym charakteryzują się idealnie płaską geometrią szkieletu *trans*-stilbenowego, natomiast stereoizomery *cis* badanych rodniców posiadają szkielet silnie zgięty.

Wszystkie kationorodniki oraz rodniki fenoksylowe są mniej stabilne niż obojętne cząsteczki. 4'-O i 4-O-rodniki są nieznacznie trwalsze energetycznie, od pozostałych (**Tabela 4.6.3.**) [188]. Wszystkie badane układy otwartopowłokowe są energetycznie trwalsze w medium wodnym. Silnie zgięty szkielet bicyklo[3.3.0]oktanowy w pallidolu jest odpowiedzialny za zwiększenie energetycznej stabilności 3-O-rodnika tego dimeru. Izomery *cis* są mniej trwałe energetycznie, niż izomery *trans* w badanych mediach. Wynik ten sugeruje, że silnie zgięta geometria szkieletu stilbenowego w stereoizomerach *cis*, powoduje zwiększenie ich energii. Ponadto, mała różnica energii między stereoizomerami geometrycznymi piceidu (6,72 kcal/mol) oznacza, że proces izomeryzacji *trans-cis* nie wymaga dużego nakładu energii. Większa wartość entalpii tej izomeryzacji dla piceidu w medium wodnym dowodzi, że woda mocniej stabilizuje układ. Analiza struktur rezonansowych (**Rys. 4.6.1. oraz 4.6.2.**) pokazuje, że 4-O-rodnik *trans*- ϵ -winiferyny oraz 4'-O-rodnik *trans*-piceidu posiada ich więcej niż odpowiedni 3-O-rodnik oraz 5-O-rodnik. W związku z tym, 4-O i 4'-O-rodniki tych substancji są trwalsze energetycznie niż 3-O i 5-O-rodniki.

Ostatnio przeprowadzone badania eksperymentalne pokazały, że TR w hepatocytach oraz komórkach ścian jelita cienkiego ulega szybkiej biotransformacji do łatwo rozpuszczalnych w wodzie i lepiej biodostępnych siarczanów(VI) [27]. W związku z tym, poznanie optymalnej geometrii siarczanów(VI) TR stanowi wstęp do poznania ich aktywności biologicznej, a w szczególności antyoksydacyjnej. Optymalizowano za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p) geometrie następujących siarczanów (VI) TR: 4'-O-siarczanu(VI), 3-O-siarczanu(VI), 3,5-O-disiarczanu(VI), 4',3-O-disiarczanu(VI) oraz 4',3,5-O-trisiarczanu(VI) (**Rys. 4.6.3.**).

Równowagowe wartości kątów torsyjnych α (C₅-C₄-C₇-C₈) oraz θ (C₇-C₈-C₉-C₁₀) przyjmują następujące wartości: 6,04°, 9,46° dla 3-O-siarczanu(VI); 1,25°, 0,29° dla 4'-O-siarczanu(VI); 4,82°, 12,89° dla 3,5-O-disiarczanu(VI); 7,64°, 8,47° dla 4',3-O-disiarczanu(VI) oraz 11,11°, 16,35° dla 3,5,4'-O-trisiarczanu(VI). Uzyskane wyniki dowodzą, że: szkielet *trans*-stilbenowy w siarczanach(VI) TR jest zgięty, zwiększenie ilości grup siarczano-

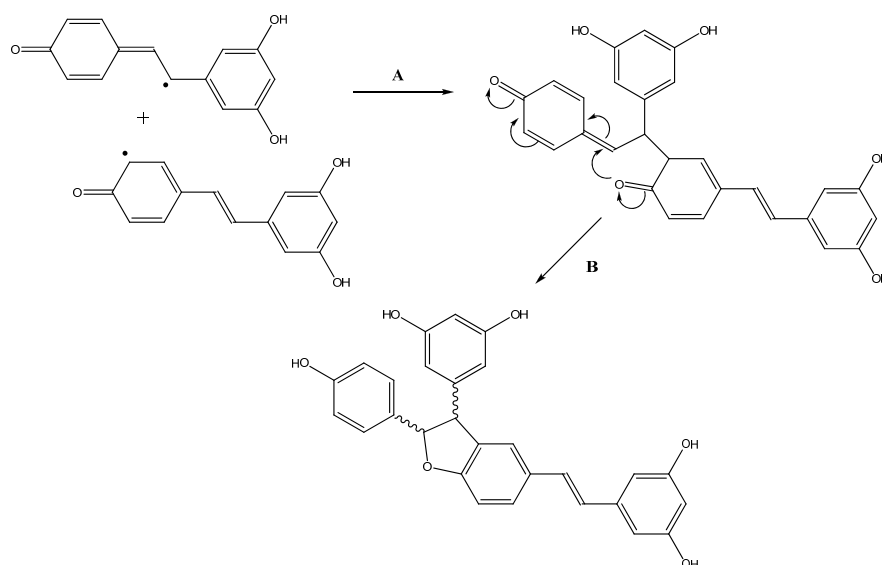
wych(VI) prowadzi do zwiększenia wartości wspomnianych kątów torsyjnych. Obecność bardzo łatwo polaryzowalnej siarki oraz silnych oddziaływań wodorowych przyczynia się do znacznej deformacji geometrii di- oraz trisiarczanów(VI). Jako przykład można podać, że w 3,5-O-disiarczanie(VI) występuje silne wiązanie wodorowe o długości 1,89 Å między atomem wodoru jednej z grup siarczanowych, a atomem tlenu drugiej grupy siarczanowej. Obecność tego wiązania wodorowego może przyczyniać się do wzrostu kwasowości, na skutek zwiększenia labilności protonu grupy siarczanowej. Zoptymalizowane wartości kątów torsyjnych β ($C_6-C_1-O_4-S$), γ ($C_{10}-C_{11}-O_3-S$) oraz δ ($C_{14}-C_{13}-O_5-S$) wskazują, że we wszystkich badanych związkach atomy siarki nie leżą w płaszczyźnie pierścieni fenylowych, podczas gdy atomy wodoru i tlenu grup hydroksylowych, związanych z pierścieniem fenylowym, znajdują się w tej płaszczyźnie. Równowagowe wartości długości wiązań O-H w siarczanach(VI) są praktycznie identyczne (**Tabela 4.6.4**). Ten wynik nie pozwala na ocenę aktywności antyoksydacyjnej badanych związków na podstawie długości wiązań O-H.



Rys. 4.6.3. Struktury siarczanów(VI) TR: a) 4'-O-siarczan(VI), b) 3-O-siarczan(VI), c) 3,5-O-disiarczan(VI), d) 4',3-O-disiarczan(VI) oraz e) 4',3,5-O-trisiarczan(VI)

Analiza otrzymanych na poziomie B3LYP/6-311++G(3df,2p) wartości momentów dipolowych (**Tabela 4.6.5.**) pokazuje, że wszystkie badane siarczany(VI) posiadają znacznie większy moment dipolowy, niż TR (3,26 D). Najbardziej polarny jest 3,5-O-disiarczan(VI) – obliczona wartość momentu dipolowego dla tego związku wynosi 10,046 D. Wynik sugeruje, że w 3,5-O-disiarczanie(VI) występuje duża deformacja gęstości elektronowej, która jest spowodowana silnie asymetryczną budową cząsteczki. Duże wartości momentów dipolowych uzasadniają dobrą rozpuszczalność siarczanów(VI) w wodzie, a, w efekcie, ich lepszą biodostępność.

Z uwagi na brak literaturowych doniesień na temat szczegółowego mechanizmu tworzenia dimeru TR, zaproponowano teoretyczny mechanizm jego powstawania (**Rys. 4.6.4**). W pierwszym etapie (etap **A**) następuje reakcja dwóch 4'-O-rodników TR, w wyniku czego powstaje produkt pośredni o strukturze chinonowej. Następnie zachodzi w nim wewnątrzcząsteczkowe przegrupowanie połączone z addycją nukleofilową (etap **B**), w efekcie czego powstaje trwały dimer. Geometrie substratów i produktów były całkowicie optymalizowane na poziomie B3LYP/6-311+G(d,p). Obliczone wartości ΔG dla etapów **A** (-120,21 kcal/mol) i **B** (-85,33 kcal/mol) dowodzą, że zaproponowane reakcje są dozwolone termodynamicznie. Obliczenia wskazują, że rodniki fenoksyłowe mogą ulegać termodynamicznie dozwolonej dimeryzacji, w wyniku której tworzy się dimer zwany *trans*- δ -winiferyną. Należy przypuszczać, że powstałe aktywne biologicznie dimery wraz z TR w cytozolu tworzą silny kompleks antyoksydacyjny. Kolejny etap badań nad tym mechanizmem będzie stanowiło wyznaczenie stałej szybkości reakcji tworzenia tego dimeru.



Rys. 4.6.4. Mechanizm syntezy *trans*- δ -winiferyny

4.7. Struktura polifenoli wyizolowanych z orzecha ziemnego (*Arachis hypogaea*)

Zoptymalizowano za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) geometrie i energie następujących pochodnych TR występujących w orzechach ziemnych: *trans*-arachidinu-1, *trans*-arachidinu-2, *trans*-arachidinu-3 oraz *trans*-3'-izopentadienylo-3,5,4'-trihidroksystilben (Rys. 1.8.1). Pochodne arachidonowe charakteryzują się obecnością w budowie unikalnego szkieletu izopentyłowego, podczas gdy *trans*-3'-izopentadienylo-3,5,4'-trihidroksystilben posiada charakterystyczną grupę izopentadienyłową. Wszystkie pochodne arachidonowe zawierają podstawnik izopentyłowy w położeniu *para* względem grupy hydroksylowej 4'-OH. *Trans*-arachidin-1, *trans*-arachidin-3 oraz *trans*-3'-izopentadienylo-3,5,4'-trihidroksystilben posiadają w budowie dwa fragmenty strukturalne w konfiguracji *trans*, natomiast *trans*-arachidin-2 posiada tylko szkielet *trans*-stilbenowy.

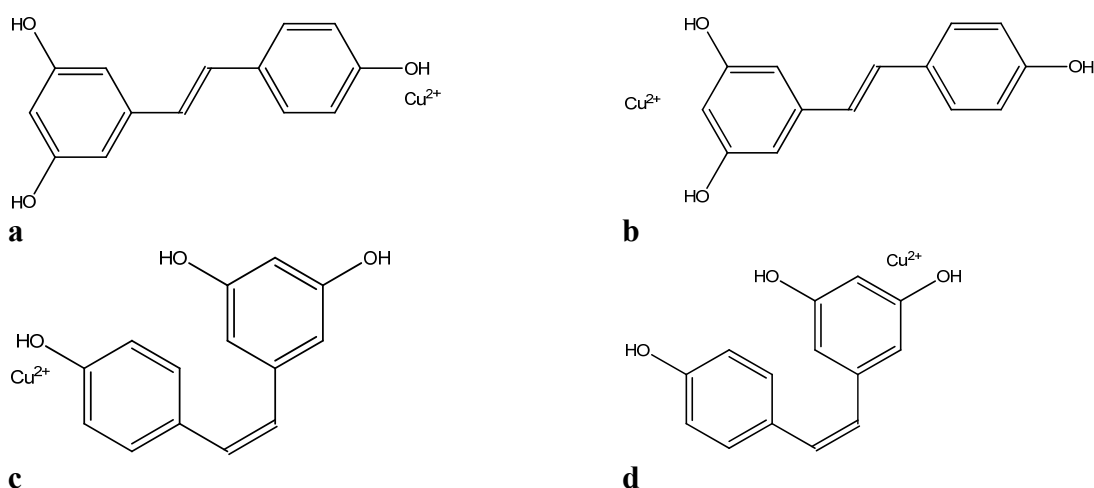
Z wyjątkiem *trans*-arachidinu-2, równowagowe geometrie pozostałych polifenoli posiadają idealnie płaski szkielet *trans*-stilbenowy (Tabela 4.7.1.). Płaski fragment izopentyłowy oraz izopentadienyłowy leży w płaszczyźnie wyznaczonej przez szkielet *trans*-stilbenowy, podczas gdy w *trans*-arachidynie-2 szkielet izopentyłowy leży w płaszczyźnie prostopadłej do szkieletu *trans*-stilbenowego. Rodniki tlenowe oraz kationorodniki badanych związków posiadają płaski szkielet *trans*-stilbenowy. Obecność podstawnika izopentyłowego oraz izopentadienyłowego zapewnia duży stopień delokalizacji niesparowanego elektronu.

Analiza energetyczna ujawniła, że *trans*-arachidin-3 jest nieznacznie trwalszy od swojego izomeru – *trans*-arachidinu-2 (Tabela 4.7.1.). Różnica ta jest konsekwencją faktu, że obecność i lokalizacja wiązania podwójnego w łańcuchu izopentyłowym zapewnia dużą delokalizację wiązania π wzdłuż całego szkieletu *trans*-arachidinu-3. W efekcie delokalizacja ta prowadzi do wzrostu stabilności energetycznej tego polifenolu. *Trans*-arachidin-2, *trans*-arachidin-3 oraz *trans*-3'-izopentadienylo-3,5,4'-trihidroksystilben charakteryzują się praktycznie identycznymi wartościami równowagowych długości wiązań 3O-H, 5O-H oraz 4'OH (Tabela 4.7.1.). W związku z tym ocena względnej trwałości tych wiązań zostanie dokonana na podstawie obliczonych wartości entalpii dysocjacji tych wiązań.

4.8. Strukturalna i energetyczna analiza kompleksów TR–Cu(II) oraz CR–Cu(II)

Równowagowe geometrie kompleksów stereoizomerów resweratrolu z Cu(II) (Rys. 4.8.1.) były wyznaczone, za pomocą B3LYP/lanl2DZ, w stanie podstawowym. W obliczeniach zastosowano bazę lanl2DZ, ponieważ zawiera ona efektywny pseudopotencjał (*effective core potential*), dobrze opisujący efekty relatywistyczne pochodzące od atomów metali cięż-

kich oraz elektronów rdzenia atomowego. Dla każdego kompleksu znajdującego się w globalnym minimum energetycznym obliczono energię stabilizacji. Dla równowagowych geometrii kompleksów wyznaczono na poziomie B3LYP/6-311++G(3df,2p) dokładniejszą wartość energii całkowitej oraz energię stabilizacji. Zastosowano metodę RO (*restricted open-shell method*), ponieważ analizowane kompleksy były układami otwartopowłokowymi. Dla obliczonych wartości energii stabilizacji wyznaczono ZPVE (*zero-point vibrational energy*) oraz BSSE, który oszacowano stosując procedurę CP [194]. ZPVE obliczano, jako różnicę między energią drgań zerowych (*Zero-Point Vibrational Energy*) kompleksu i energią tych drgań obliczoną dla równowagowych monomerów tworzących analizowane kompleksy. W celu znalezienia najbardziej preferencyjnych miejsc koordynacji jonu Cu^{2+} do TR oraz CR, obliczono rozkład ładunków cząstkowych w TR oraz CR, za pomocą analizy populacyjnej NBO na poziomie B3LYP/6-311++G(3df,2p). Równowagowe geometrie izolowanych kompleksów optymalizowano w medium wodnym, stosując model solwatacyjny C-PCM.



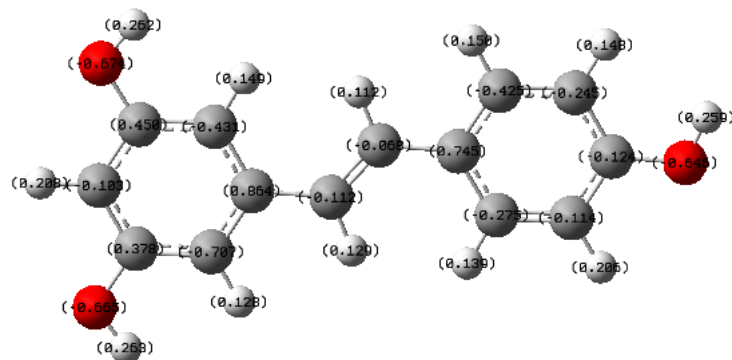
Rys. 4.8.1. Kompleksy TR i CR z jonem Cu^{2+} a) TR-4'-O-Cu(II), b) TR-3-O-Cu(II), c) CR-4'-Cu(II), d) CR-3-O-Cu(II)

Wszystkie równowagowe geometrie kompleksów TR z Cu^{2+} posiadają płaski szkielet *trans*-stilbenowy w badanych mediach, natomiast kompleksy CR z Cu^{2+} mają geometrię wyraźnie zgiętą, podobnie, jak obojętna cząsteczka CR [215]. Analiza energetyczna i termodynamiczna zoptymalizowanych kompleksów dowodzi, że wszystkie *cis*-kompleksy są mniej trwałe energetycznie i termodynamicznie, od kompleksów *trans* (**Tabela 4.8.2.**). Ponadto, obliczenia pokazały, że najtrwalszy energetycznie jest kompleks TR-3-O-Cu(II) (**Rys. 4.8.1.b**). Zatem, koordynacja Cu^{2+} do atomu 3-O TR jest najbardziej preferowana energetycznie.

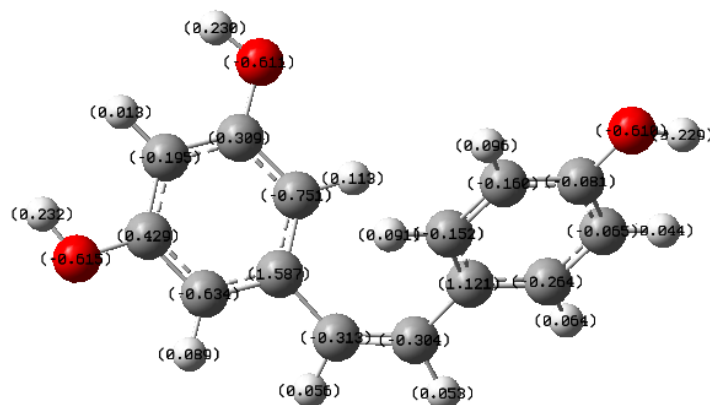
Równowagowe długości wiązań Cu-O3 oraz Cu-O5 w najtrwalszym energetycznie kompleksie (**Rys. 4.8.1.b**), wynoszące 1,83 Å oraz 3,21 Å dowodzą, że jon Cu(II) jest silnie związany z atomem tlenu grupy 3-OH. Natomiast długości wiązania Cu-O4' w kompleksie TR-4'-O-Cu(II) (**Rys. 4.8.1.a**) oraz CR-4'-O-Cu(II) (**Rys. 4.8.1.c**) wynosiły odpowiednio: 1,91 Å i 1,98 Å. Stąd wnioskujemy, że jon Cu²⁺ jest słabiej związany z atomem O4' niż z O3 oraz O5. Analiza położenia jonu Cu(II) w kompleksie TR-3-O-Cu(II) pokazuje, że znajduje się on w płaszczyźnie szkieletu TR. W medium wodnym wiązania te są krótsze i, w efekcie, trwalsze z powodu silnego oddziaływania elektrostatycznego jonu Cu²⁺ oraz grup hydroksylowych z medium wodnym.

Analiza energii stabilizacji (**Tabela 4.8.1.**) dowodzi, że jon Cu²⁺ jest najsilniej związany z atomem tlenu grupy 3-OH [215]. Otrzymany wynik pozostaje w zgodności z obliczonymi wartościami ładunków cząstkowych na poszczególnych atomach TR oraz jego izomeru *cis* (**Rys. 4.8.2.**). Analiza NBO rozkładu ładunku ujawniła, że najmniejszy ujemny cząstkowy ładunek jest zlokalizowany na atomach tlenu 3-O oraz 5-O – te atomy tlenu stanowią główne centra koordynacyjne dla jonu Cu²⁺. Większe różnice w wartościach ładunku cząstkowego między atomami tlenu grup OH obserwujemy dla TR, co jest rezultatem silnej koniugacji pierścieni aromatycznych w tym związku. Obliczone wartości energii stabilizacji dla kompleksów pokazują, że Cu(II) tworzy trwalsze energetycznie kompleksy z TR niż z CR. Geometrie badanych kompleksów są scharakteryzowane bardzo dużymi wartościami energii stabilizacji. Stąd wnioskujemy, że wykazują one szczególnie dużą stabilność, a ich składniki są silnie związane. Wyniki dowodzą, że TR jest efektywną substancją chelatującą Cu(II), co jest zgodne z wynikami eksperymentalnymi [61].

Medium wodne silniej stabilizuje kompleksy TR-Cu(II), niż próżnia (**Tabela 4.8.2.**) [215]. W tym medium kompleksy te charakteryzują się znacznie większą energią stabilizacji, niż w próżni (**Tabela 4.8.1.**). Z uwagi na to, że badane kompleksy stanowią formy kationowe, silne oddziaływania elektrostatyczne między nimi i medium wodnym, przyczyniają się do zwiększenia ich stabilności. Uwzględnienie poprawek BSSE i ZPVE prowadzi do zmniejszenia energii stabilizacji badanych kompleksów. Ponadto, w środowisku polarnym obserwujemy zmniejszenie długości wiązania Cu-O w kompleksie TR-3-O-Cu(II). Wynik ten jest skorelowany z wartościami obliczonych energii i dowodzi większej trwałości tych wiązań w medium wodnym. Szkielet *trans*-stilbenowy jest płaski, a *cis*-stilbenowy wyraźnie zgięty w badanych mediach.



a



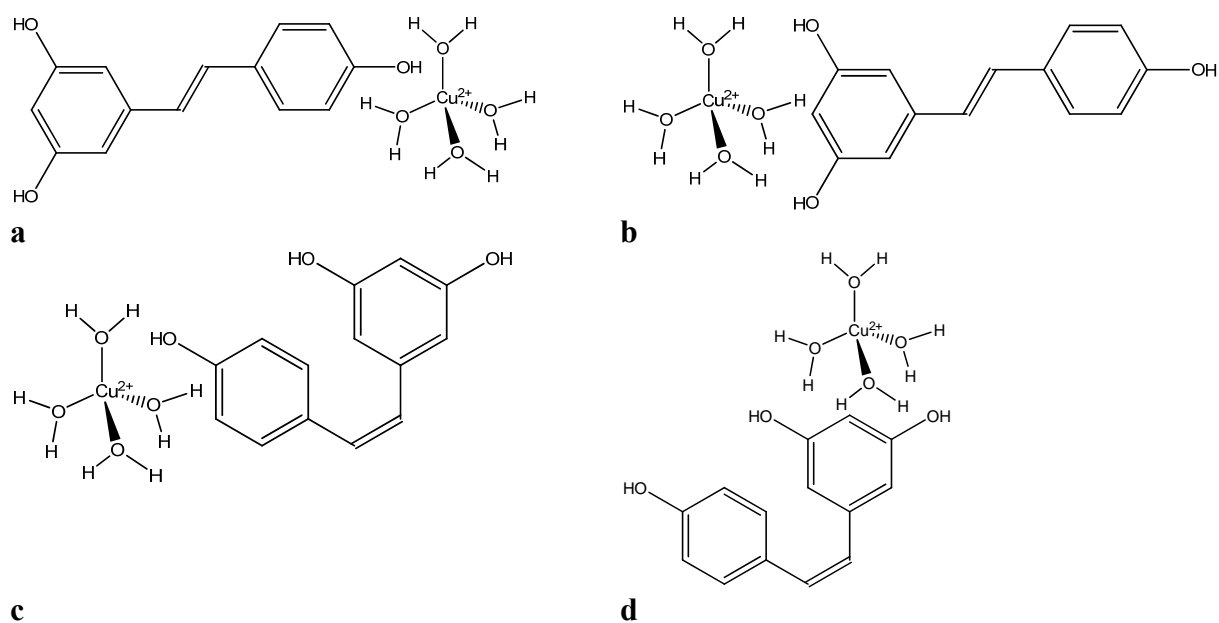
b

Rys. 4.8.2. Rozkład NBO ładunków cząstkowych na atomach: a) TR oraz b) CR

4.9. Strukturalna i energetyczna analiza akwakompleksów TR z Cu(II)

Ponieważ woda stanowi środowisko reakcji w układach biologicznych, a jon Cu(II) ulega w niej hydratacji, wyznaczono równowagowe geometrie akwakompleksów stereoizomerów resweratrolu z jonem Cu²⁺. Jon ten otaczano sferą hydratacyjną o zmiennej ilości molekuł wody. Geometrie wszystkich akwakompleksów zoptymalizowano w pierwszym etapie za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p), a następnie reoptymalizowano za pomocą B3LYP/lanl2DZ. Ponieważ badane układy kompleksowe były otwartopowłokowe, we wszystkich obliczeniach zastosowano metodę RO (*restricted open-shell method*). Obliczono na poziomie B3LYP/6-311++G(3df,2p) rozkład ładunków cząstkowych, energie całkowite z poprawką ZPE oraz energie stabilizacji akwakompleksów. W obliczeniach zastosowano kompleksy typu stereoizomer resweratrolu-Cu(II)[H₂O]₁₋₄. Na **Rys. 4.9.1.** pokazano przykładowe tetraedryczne kompleksy, w których jon Cu²⁺ otoczony jest czterema cząsteczkami wody. W ten sposób zbadano wpływ ilości skoordynowanych do Cu(II) cząsteczek wody, na stabilność badanych układów kompleksowych. Efekty solwatacyjne od medium wodnego uwzględniono w obliczeniach za pomocą modelu C-PCM.

Zoptymalizowane struktury, różniące się ilością molekuł wody w sferze koordynacyjnej, znajdowały się w położeniach równowagi na PES. Najtrwalsze energetycznie są układy, w których do jonu Cu^{2+} skoordynowane są cztery cząsteczki wody [215]. W kompleksach tych molekuły wody wyznaczają wierzchołki nieznacznie zdeformowanego tetraedru. Porównując wartości energii dla *cis*- oraz *trans*-akwakompleksów widzimy, że kompleksy *trans* są trwalsze w badanych środowiskach. W medium wodnym obserwujemy wyraźne zmniejszenie energii badanych kompleksów w porównaniu z próżnią. Jest to spowodowane silnym oddziaływaniem tego środowiska z formami kationowymi badanych kompleksów.



Rys. 4.9.1. Akwakompleksy TR z jonem Cu^{2+} : a) TR-4'-O-Cu(II)(H₂O)₄, b) TR-3-O-Cu(II)(H₂O)₄, c) CR-4'-O-Cu(II)(H₂O)₄, d) CR-3-O-Cu(II)(H₂O)₄

Trans-akwakompleksy posiadają płaski szkielet *trans*-stilbenowy, a kompleksy o konfiguracji *cis* mają szkielet wyraźnie zgięty [215]. Średnia równowagowa odległość między jonem Cu^{2+} , a atomem tlenu wody w najtrwalszym energetycznie kompleksie *trans* wynosi 1,832 Å w próżni oraz 1,789 Å w medium wodnym. Stąd wnioskujemy, że: cząsteczki wody są silnie związane z jonem Cu^{2+} , medium wodne wnosi duży wkład do stabilizacji tych wiązań. W najtrwalszym energetycznie kompleksie *trans* (**Rys. 4.9.1.b**) i *cis* (**Rys. 4.9.1.d**) molekuły wody tworzą wokół Cu(II) zdeformowany tetraedr [215]. W przypadku równowagowych geometrii kompleksów, w których jon Cu^{2+} był otoczony przez sześć molekuł wody, strefa hydratacyjna tworzyła zdeformowaną piramidę pentagonalną. Silne oddziaływania wolnych par elektronowych cząsteczek wody przyczyniają się do tej deformacji. Równowagowe geometrie akwakompleksów charakteryzują się znacząco większą długością wiązania Cu–O3 oraz Cu–O4', w porównaniu z omawianymi kompleksami, niezawierającymi cząsteczek wo-

dy. W konsekwencji, w akwakompleksach, jon Cu^{2+} jest słabo związany z atomami tlenu grup OH stereoizomerów resweratrolu.

Dla kompleksów $\text{TR-Cu(II)-(H}_2\text{O)}_{1-4}$ oraz $\text{CR-Cu(II)-(H}_2\text{O)}_{1-4}$, znajdujących się w globalnym minimum energetycznym obliczono energie stabilizacji (**Tabela 4.9.1.**). Obliczenia pokazały, że istnieje korelacja między ilością skoordynowanych z Cu(II) molekuł wody, a energią stabilizacji. Kompleksy posiadające Cu(II) z czterema skoordynowanymi molekułami wody charakteryzują się największą wartością energii stabilizacji [215]. Wynik ten dowodzi, że przy takiej geometrii udział oddziaływań elektrostatycznych w stabilizacji jest największy. Medium wodne w sposób znaczący zwiększa tę energię i, tym samym, zwiększa stabilność rozważanych układów. Analiza energii stabilizacji pokazuje, że hydratacja Cu(II) bardzo zmniejsza wartość energii stabilizacji. Silne oddziaływania elektrostatyczne między jonem Cu^{2+} , a molekułami wody prowadzą do zwiększenia oddziaływania Cu(II) z grupami hydroksylowymi TR. Porównując wartości BSSE oraz ZPVE, wyznaczone dla akwakompleksów, zauważamy ich większy wpływ na wartości energii stabilizacji w porównaniu z kompleksami nieposiadającymi zhydratowanego jonu Cu^{2+} .

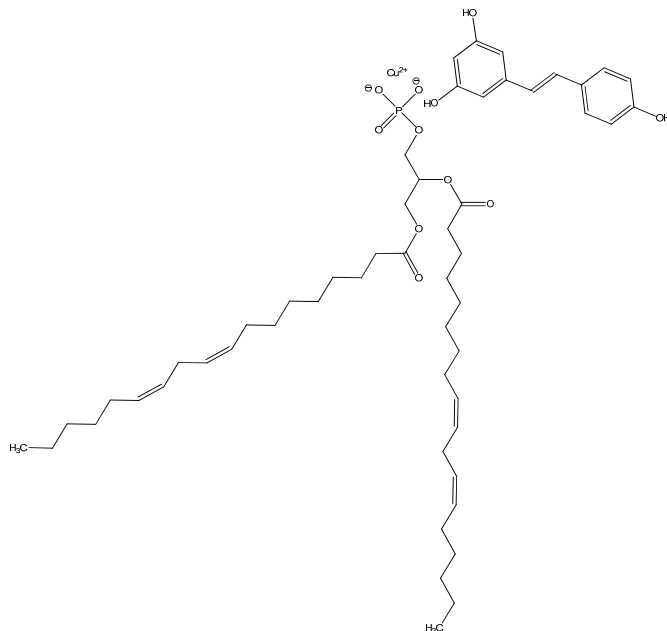
4.10. Oddziaływanie kompleksów TR-Cu(II) z fosfolipidem

Badania ostatnich lat pokazały, że TR w obecności jonów Cu^{2+} efektywnie hamuje proces niekorzystnej peroksydacji lipoproteiny LDL. W wyniku tego procesu powstają bowiem szkodliwe rodniki alkilowe kwasów tłuszczowych, które powodują degradację błon komórkowych. Biorąc pod uwagę ten fakt oraz to, że LDL składa się rdzenia złożonego z estryfikowanych cząsteczek cholesterolu i otoczonego sferą hydrofilowych fosfolipidów [199], badanie teoretyczne interakcji kompleksów TR-Cu(II) z fosfolipidami jest w pełni uzasadnione. Znalezienie równowagowej geometrii kompleksów $\text{TR-Cu(II)-fosfolipid}$ (*cis,cis*-1,2-dilinolenolan-3-fosforan(V) glicerolu) oraz zbadanie natury oddziaływań w tych kompleksach, ma kluczowe znaczenie w zrozumieniu prooksydacyjnej aktywności TR w obecności Cu(II) .

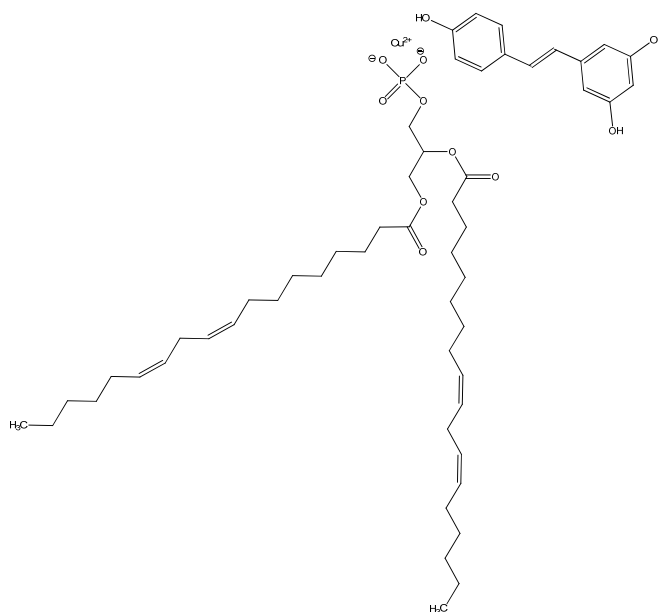
Kompleksy $\text{TR-Cu(II)-fosfolipid}$ były w pierwszym kroku całkowicie optymalizowane na poziomie B3LYP/631+G(d,p), a następnie reoptymalizowane w stanie podstawowym przy zastosowaniu B3LYP/lanl2DZ. Dla równowagowych geometrii, otrzymanych za pomocą B3LYP/lanl2DZ, obliczono dokładniejszą wartość energii na poziomie B3LYP/6-311++G(3df,2p). Otrzymane wartości energii zastosowano do obliczenia energii stabilizacji. Do obliczeń zastosowano fosfolipid w formie dianionowej, który jest monoestrem glicerolu

oraz kwasu fosforowego(V) i jednocześnie – diestrem nienasyconego kwasu *cis,cis*-linolowego. W celu wyznaczenia najstabilniejszej energetycznie geometrii kompleksu oraz najbardziej preferowanego miejsca koordynacji jonu Cu^{2+} , zoptymalizowano struktury pokazane na **Rys. 4.10.1**. Efekty solwatacyjne wyznaczono za pomocą modelu solwatacyjnego COSMO.

Znalezione optymalne geometrie znajdowały się w lokalnych minimach energetycznych na PES. Analiza energetyczna pokazała, że równowagowa struktura **4.10.1.b** posiada energię (z uwzględnieniem poprawki ZPE) równą -2708,7221 [hartree], natomiast struktura **4.10.1.a** energię równą -2708,2319 [hartree]. Stąd wnioskujemy, że najtrwalszy energetycznie jest układ kompleksowy **4.10.1.b**. Obliczone wartości energii stabilizacji równe 125,45 kcal/mol dla struktury **4.10.1.b** i 118,76 kcal/mol dla struktury **4.10.1.a** dowodzą, że: fosfolipid jest silnie związany z kompleksem TR–Cu(II), najtrwalszym energetycznie kompleksie, jon Cu^{2+} jest silnie związany z dianionową resztą monofosforanu oraz atomem O4' TR [215]. Silne oddziaływanie elektrostatyczne między kationem Cu^{2+} , a dianionem monofosforanu ma wpływ na stabilizację badanego układu. Sugeruje to, że kompleks TR–Cu(II) może wykazywać silne powinowactwo do wiązania z zewnętrzną hydrofilową sferą cząsteczek LDL oraz z fosfolipidami, stanowiącymi integralny składnik błon komórkowych.



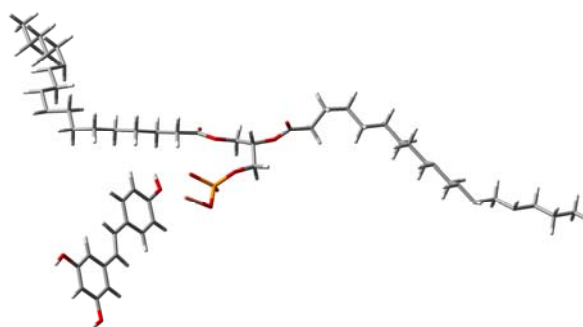
a



b

Rys. 4.10.1. Struktury kompleksów TR–Cu(II) z fosfolipidem: a) TR-3-O-Cu(II)–fosfolipid, b) TR-4'-O-Cu(II)–fosfolipid

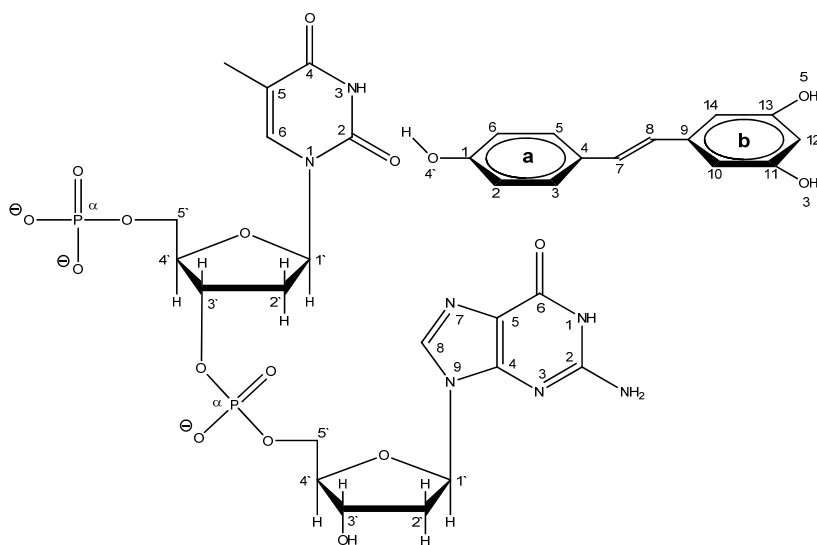
Najtrwalszy energetycznie kompleks (**Rys. 4.10.2.**) posiada płaski szkielet *trans*-stilbenowy, który ułatwia wiązanie się kompleksu TR–Cu(II) z fosfolipidami [215]. Optymalna długość wiązania Cu(II)–4'-O w równowagowej geometrii TR–Cu(II)–fosfolipid wynosi 1,82 Å w próżni i 1,68 Å w medium wodnym. Wynik ten dowodzi, że medium wodne silnie stabilizuje to wiązanie i przyczynia się do wzrostu trwałości rozważanego kompleksu. W najtrwalszej energetycznie geometrii kompleksu TR–Cu(II)–fosfolipid jon Cu^{2+} leży w płaszczyźnie, wyznaczonej przez ujemnie naładowane atomy tlenu grupy fosforanowej(V) oraz atom fosforu. Analiza wzajemnego ułożenia atomu O4', jonu Cu^{2+} oraz ujemnie naładowanego atomu tlenu grupy fosforanowej(V) wskazuje, że leżą one na jednej linii. Taka konfiguracja atomów umożliwia trwałe związanie jonu Cu^{2+} z atomem tlenu O4' oraz atomem tlenu grupy fosforanowej(V).



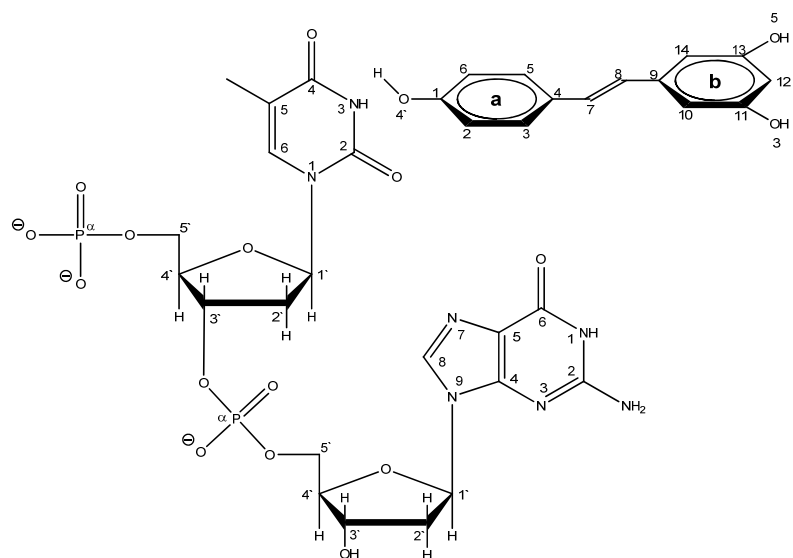
Rys. 4.10.2. Zoptymalizowana geometria kompleksu TR–Cu(II)–fosfolipid za pomocą B3LYP/lanl2DZ

4.11. Oddziaływanie TR z di nukleotydem DNA

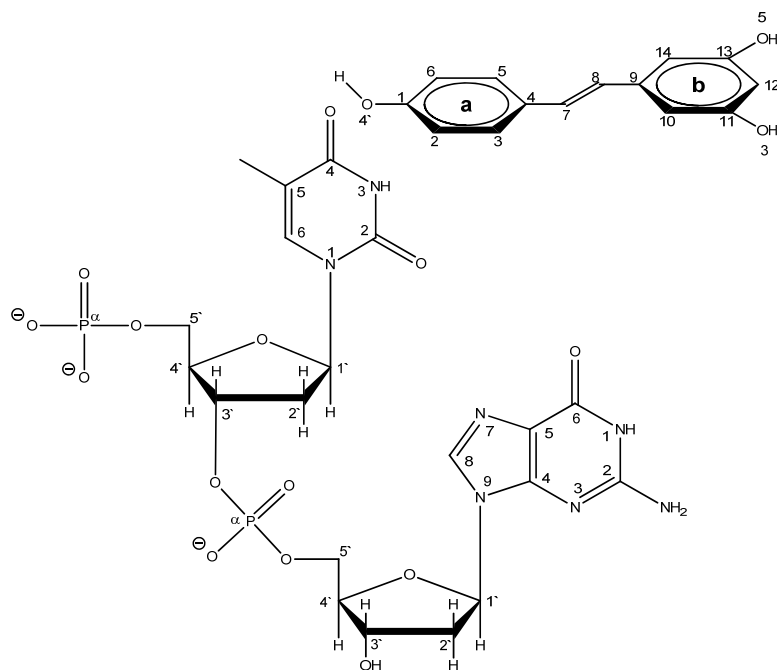
Wykonano obliczenia, które pozwoliły znaleźć równowagową geometrię kompleksu TR z dinukleotydem, zawierającym reszty tymidyny oraz deoksyguanozyny. Równowagowe geometrie monomerów (TR oraz dinukleotydy) i kompleksów TR-dinukleotydy wyznaczono na poziomie B3LYP/6-311+G(d,p) w stanie podstawowym, w próżni i w medium wodnym za pomocą modelu C-PCM. Ponieważ w układach biologicznych nukleotydy posiadają reszty fosforanowe(V) w formie dianionowej [199], optymalizowano geometrie dinukleotydu oraz kompleksów, które zawierały dianiony reszty fosforanowej(V) w pozycji α . Geometrie kompleksów zoptymalizowano przy różnych położeniach TR względem szkieletu dinukleotydu (**Rys. 4.11.1.**), w celu wyznaczenia energetycznie najstabilniejszej geometrii. We wszystkich badanych układach guanina i tymina były w położeniu *anti* względem szkieletu β -D-deoksyrybofuranozy. Dla równowagowych geometrii obliczono dokładniejszą energię za pomocą MP2(full)/6-311++G(3df,2p). W ten sposób uwzględniono znaczący wkład energii korelacyjnej do energii stabilizacji. Energię stabilizacji ΔE_{stab} wraz z poprawką BSSE obliczano dla równowagowych geometrii kompleksów na poziomie MP2(full)/6-311++G(3df,2p) oraz B3LYP/6-311++G(3df,2p).



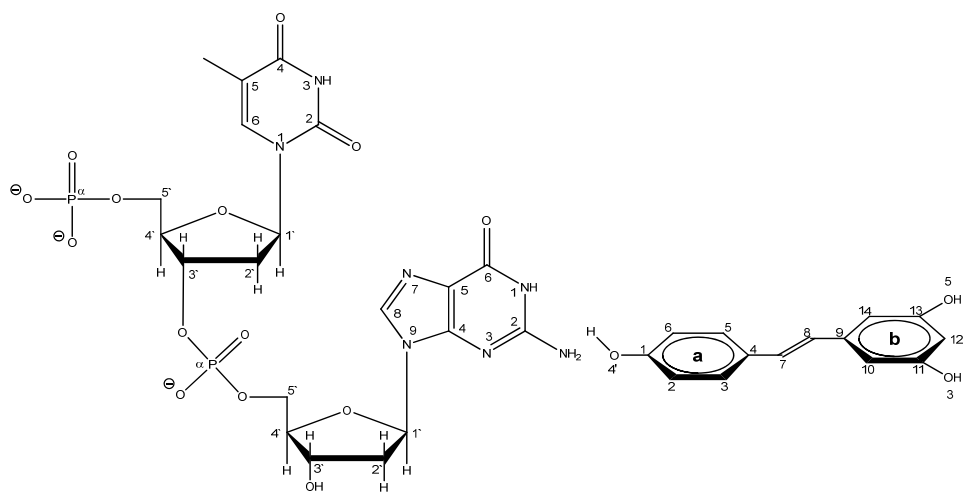
a



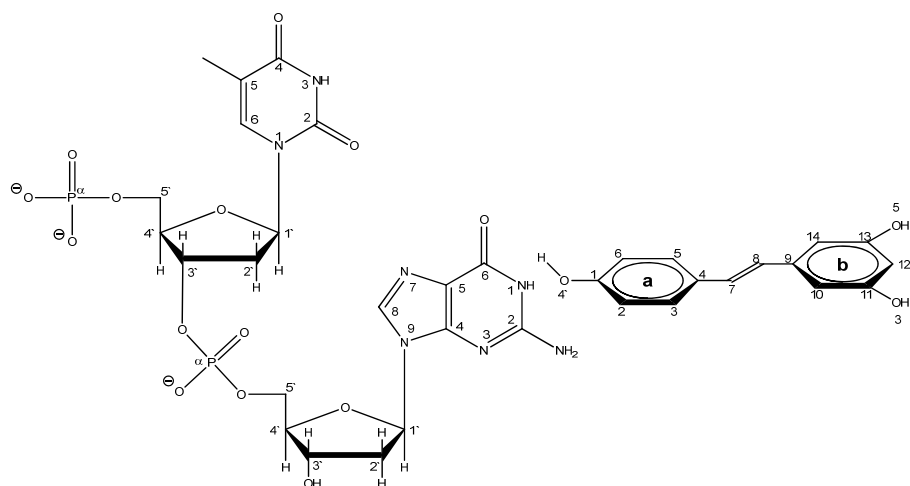
b



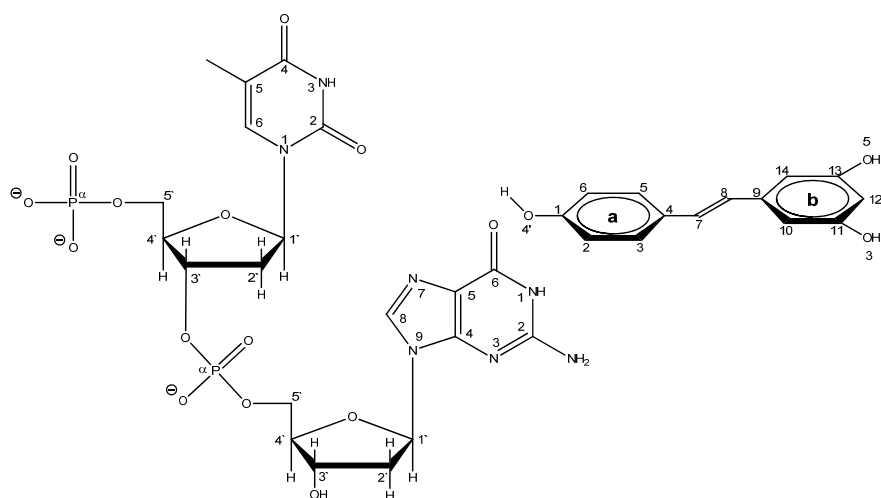
c



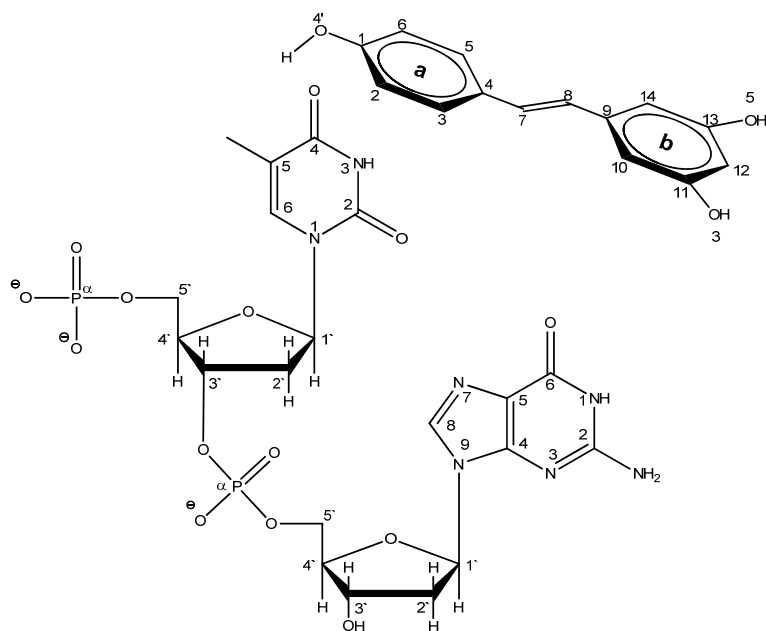
d



e

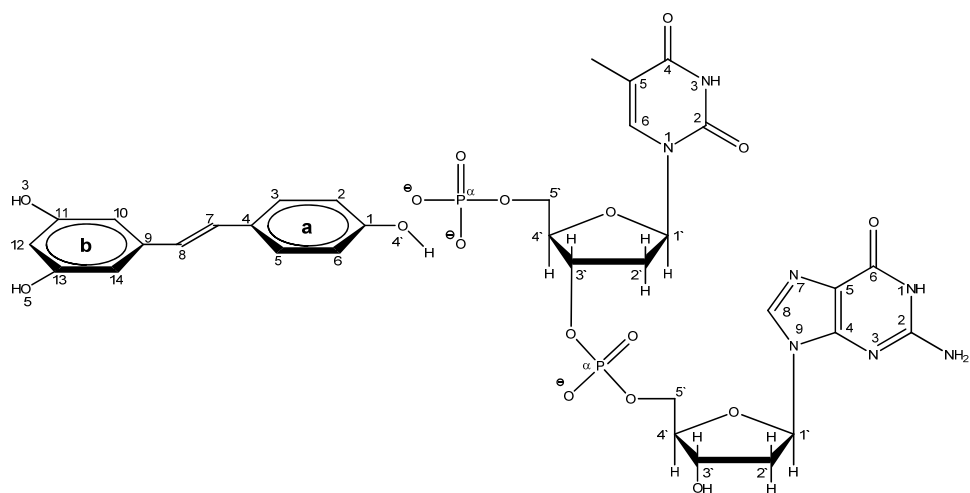


f



g



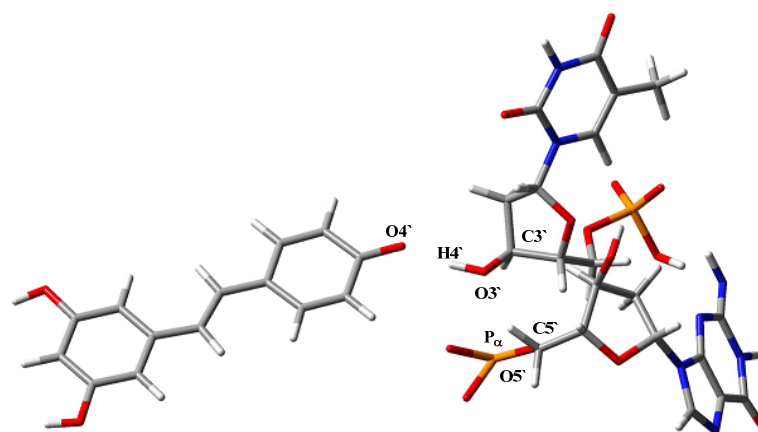


k

Rys. 4.11.1. Kompleksy TR z dinukleotydem

Analiza otrzymanych energii równowagowych geometrii ujawniła, że najtrwalszy energetycznie jest kompleks **4.11.1.i** (Rys. 4.11.1.i), co dowodzi, że TR silnie oddziałuje z wiązaniem fosfodiesterowym, łączącym dinukleotydy. TR w tym kompleksie posiada idealnie płaski szkielet *trans*-stilbenowy. Silne oddziaływanie grupy 4'-OH TR z wiązaniem fosfodiesterowym spowodowało przeniesienie protonu z grupy 4'-OH na atom O3' deoksyrybozy (Rys. 4.11.2). Transfer protonu jest możliwy dzięki elektrostatycznemu oddziaływaniu grupy 4'-OH z ujemnie naładowanymi atomami tlenu grupy monofosforanowej, tworzącej wiązanie fosfodiesterowe. Ponadto, analiza populacyjna ładunku NBO w równowagowym kompleksie TR-dinukleotyd wykazała, że na atomie 4'-O cząstkowy ładunek wynosi -0,518, natomiast w nieskompleksowanym TR -0,312. Wynik ten potwierdza przeniesienie protonu i wytworzenie anionu TR. Najtrwalszy energetycznie kompleks TR-dinukleotyd charakteryzuje się obecnością silnego wiązania wodorowego o długości 1,62 Å pomiędzy atomem wodoru grupy aminowej guaniny i atomem tlenu reszty fosforanowej(V). Duża trwałość tego wiązania sugeruje, że przyczynia się ono do stabilizacji energetycznej kompleksu **4.11.1.i**. W kompleksie tym równowagowa odległość między atomami tlenu O3' deoksyrybozy oraz fosforem wynosi 2,95 Å w próżni oraz 2,68 Å w medium wodnym. Tak duże wartości tej odległości dowodzą, że interakcja TR z dinukleotydem może prowadzić do rozerwania wiązania 3'-5' fosfodiesterowego, które jest uznawane za jedno z najsilniejszych wiązań polarnych w biomolekułach [199]. Wyjątkowo duża trwałość tego wiązania wynika z obecności ujemnie naładowanych atomów tlenu, które zmniejszają podatność tego wiązania na hydrolizę. Ponieważ wiązania fosfodiesterowe tworzą szkielet DNA, otrzymany wynik sugeruje, że TR może powodować rozpad nici DNA. Rezultat ten pokazuje, że aktywność antynowotworowa, antyproliferacyjna

oraz antyreplicacyjna TR może być silnie związana z jego zdolnością do indukowania tego procesu. Ostatnio Kang i wsp. [200] pokazali, że TR jest efektywną substancją, która powoduje rozpad nici DNA w komórkach białaczki złośliwej. Również badania Zhou i wsp. [201] udowodniły, że związek ten indukuje rozpad nici DNA w chromatynie jądrowej komórek raka żołądka. Biorąc pod uwagę te wyniki eksperymentalne należy stwierdzić, że przeprowadzone obliczenia kwantowe potwierdzają wykazaną eksperymentalnie zdolność *trans*-resweratrolu do indukowania rozpadu nici DNA.



Rys. 4.11.2. Zoptymalizowana na poziomie B3LYP/6-311+G(d,p) najtrwalsza energetycznie geometria kompleksu TR-dinukleotydu

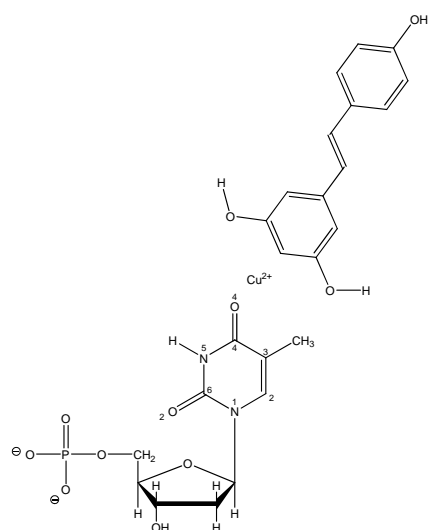
W zdrowych komórkach trwałe rozerwanie wiązania fosfodiesterowego przez TR jest mało prawdopodobne, gdyż komórki te wyposażone są w specjalne kompleksy enzymatyczne, które umożliwiają szybką regenerację rozerwanej nici DNA [199]. W tych komórkach istnieją dwa mechanizmy naprawy pękniętej nici DNA: łączenie niehomologicznych zakończeń oraz naprawa rekombinacyjna [199]. W pierwszym mechanizmie szczególnie aktywna jest topoizomeraza II oraz ligaza DNA wraz z wyspecjalizowanym czynnikiem XRCC4, umożliwiającym połączenie dwóch rozerwanych nici. Natomiast w drugim mechanizmie naprawa uszkodzonej nici odbywa się przy udziale siostrzanej chromatydy, bądź chromosomu homologicznego.

Analiza obliczonych wartości ΔE_{stab} (**Tabele 4.11.1. i 4.11.2.**) dowodzi, że najtrwalszy układ molekularny stanowi kompleks **4.11.1.i**. Bardzo duże wartości energii stabilizacji świadczą o silnym związaniu składników badanych kompleksów. Porównując wartości energii stabilizacji w badanych środowiskach widzimy, że medium wodne znacznie podwyższa wartości tych energii. BSSE ma mały wpływ na wartość energii stabilizacji o czym świadczą małe różnice pomiędzy energiami stabilizacji oraz energiami stabilizacji z uwzględnieniem

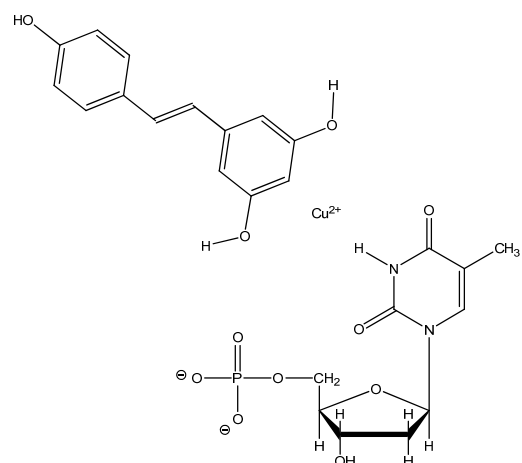
tych poprawek. Obliczone wartości ΔE_{stab} za pomocą MP2(full)/6-311++G(3df,2p) (**Tabela 4.11.2.**) są znacząco większe od obliczonych przy użyciu B3LYP/6-311++G(3df,2p) (**Tabela 4.11.1.**). Wynik ten sugeruje, że najprawdopodobniej energia dyspersyjna Londona, pochodząca od słabych oddziaływań π - π między pierścieniami aromatycznymi TR i zasad azotowych wnosi duży wkład do zwiększenia energii stabilizacji tych układów [213]. Hipoteza ta wymaga przeprowadzenia dodatkowych obliczeń w celu ilościowego oszacowania wkładu tego oddziaływania do energii stabilizacji. W szczególności, należy obliczyć energie stabilizacji, stosując metodę DFTB (*Density functional tight-binding*), która pozwala wyznaczyć ilościowo wkład energii dyspersji Londona do stabilizacji kompleksów [221]. Podsumowując, otrzymane wyniki pokazują, że w układach biologicznych, TR może tworzyć trwałe kompleksy z dinuklotydami.

4.12. Kompleksy TR–Cu(II)–5'-monofosforan(V) tymidyny oraz TR–Cu(II)(H₂O)₄–5'-monofosforan(V) tymidyny

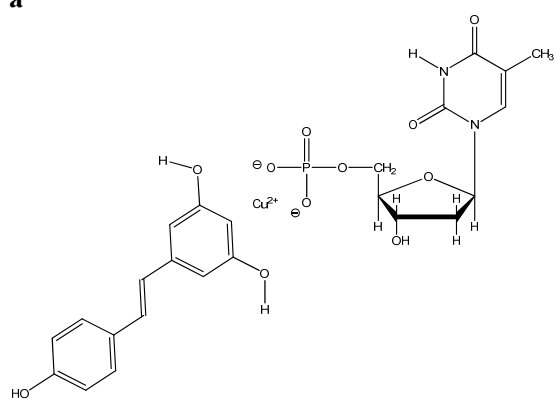
Badania Fukuhary i Miyaty [60] po raz pierwszy pokazały, że w obecności TR oraz jonów Cu^{2+} następuje rozpad nici DNA. Zbadanie interakcji kompleksów TR–Cu(II) z 5'-monofosforanem(V) tymidyny jest niezbędne do lepszego zrozumienia antynowotworowej aktywności TR. W związku z tym, wyznaczono równowagową geometrię układu TR–Cu(II)–5'-monofosforan tymidyny oraz energie stabilizacji dla badanych kompleksów. Wszystkie obliczenia dla izolowanych kompleksów z Cu^{2+} wykonano w stanie podstawowym za pomocą B3LYP/lanl2DZ. Geometrie kompleksów całkowicie zoptymalizowano przy różnych konfiguracjach kompleksów TR–O3–Cu(II) oraz TR–O4'–Cu(II) względem centrów donorowych 5'-monofosforanu(V) tymidyny (**Rys. 4.12.1.**). W obliczeniach reszta fosforanowa(V) 5'-monofosforanu(V) tymidyny była dianionem, gdyż w układach biologicznych takie formy są dominujące. Dla każdego równowagowego połączenia, otrzymanego za pomocą B3LYP/lanl2DZ, obliczono dokładniejszą energię (z uwzględnieniem ZPE) za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p). Energie te wykorzystano do obliczania energii stabilizacji kompleksów. Dla każdej obliczonej wartości energii stabilizacji obliczono poprawkę BSSE stosując metodę CP.



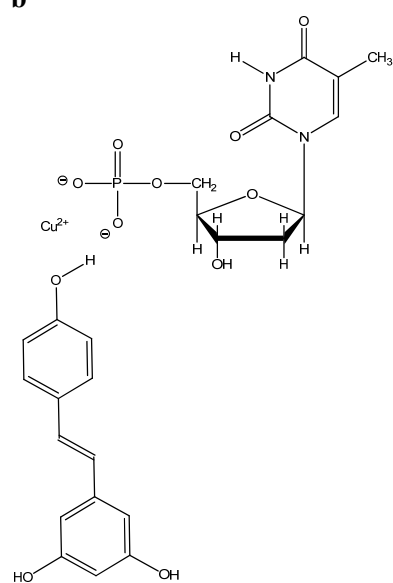
a



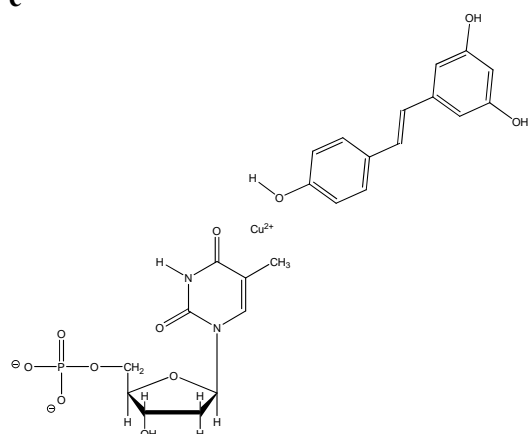
b



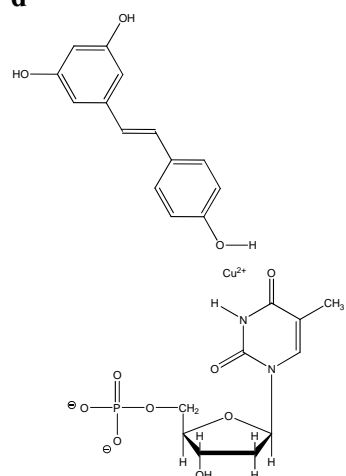
c



d



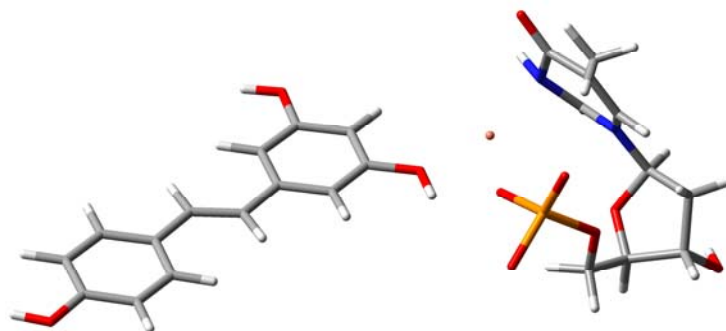
e



f

Rys. 4.12.1. Geometrie połączeń TR-O3-Cu(II) oraz TR-O4'-Cu(II) z 5'-monofosforanem(V) tymidyny

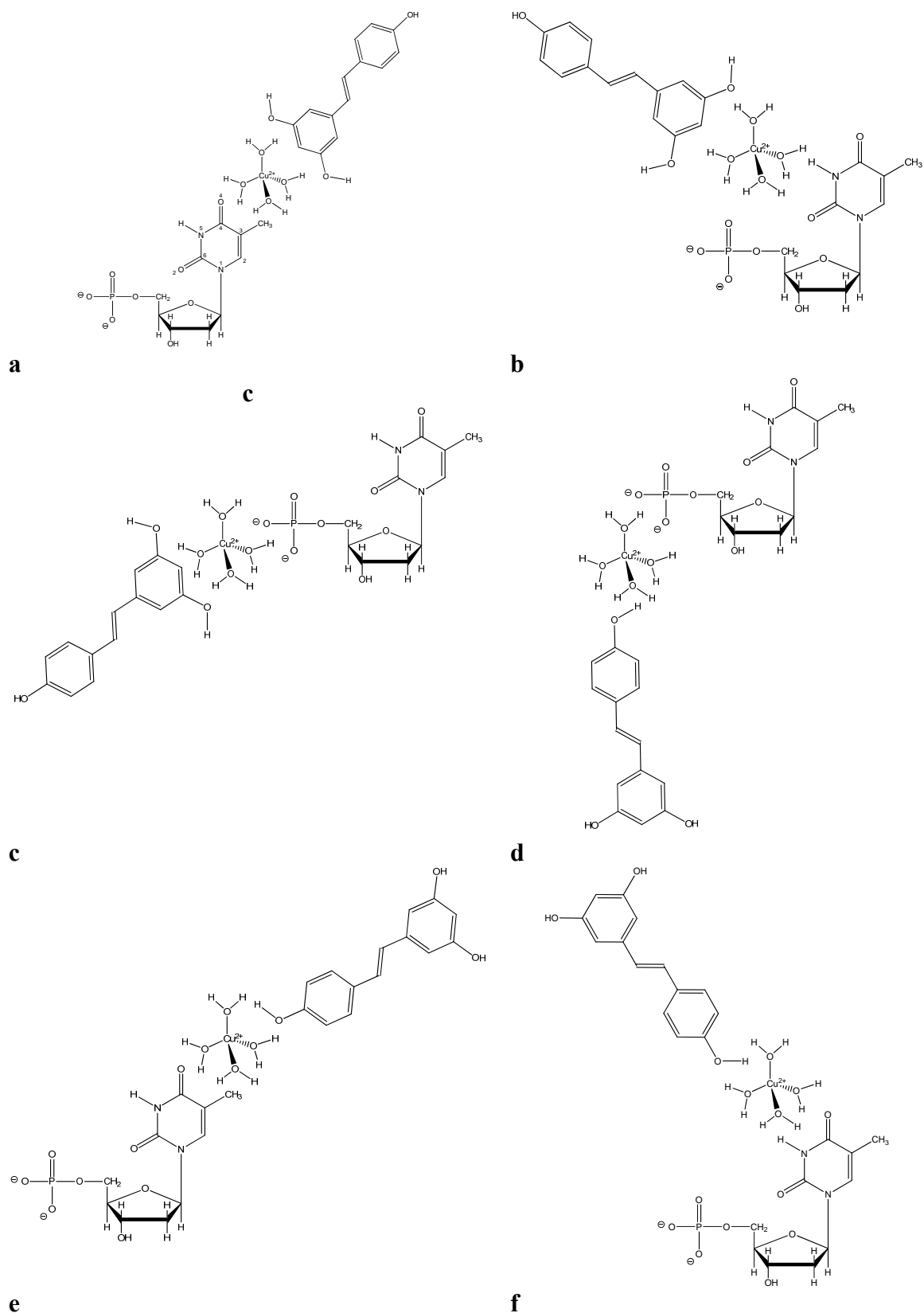
Najtrwalsza energetycznie jest struktura **4.12.1.c (Rys. 4.12.1.c)**, w której Cu(II) wiąże się z ujemnie naładowanymi atomami tlenu reszty fosforanowej 5'-monofosforanu(V) tymidyny oraz atomem O3 TR (**Rys. 4.12.2**). Zoptymalizowana wartość długości wiązania pomiędzy jonem Cu^{2+} , a atomem tlenu grupy fosforanowej w kompleksie **4.12.1.c**, wynosi 1,84 Å, co dowodzi, że wiązanie to jest trwałe. We wszystkich badanych połączeniach TR–Cu(II)–5'-monofosforan tymidyny szkielet *trans*-stilbenowy jest płaski. Taka geometria przyczynia się w dużej mierze do wzrostu stabilności badanych kompleksów.



Rys. 4.12.2. Równowagowa geometria połączenia TR–Cu(II)–5'-monofosforan(V) tymidyny

Bardzo duże wartości energii stabilizacji (**Tabela 4.12.1.**) dowodzą, że składniki wszystkich badanych kompleksów są silnie związane. Podobnie, jak w przypadku kompleksów TR z dinukleotydem, uwzględnienie w obliczeniach BSSE nieznacznie zmniejsza wartość ΔE_{stab} .

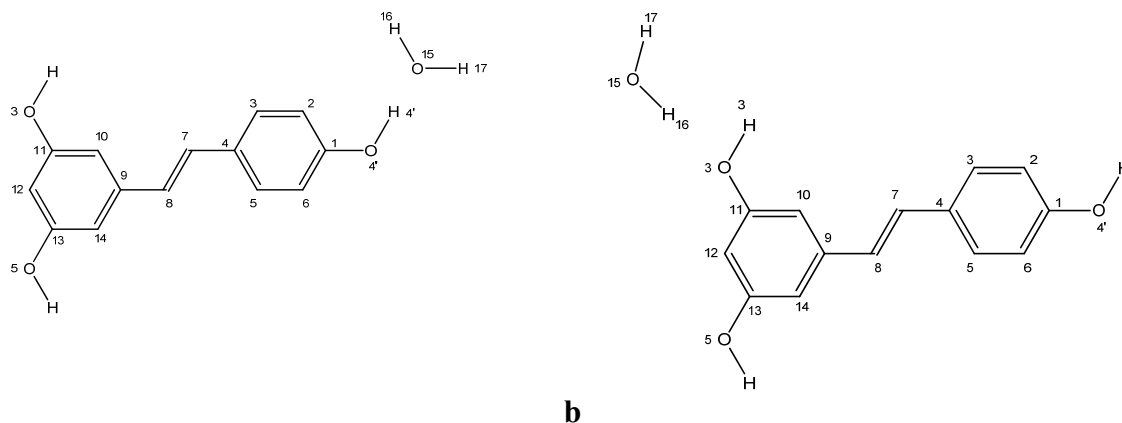
Badano wpływ hydratacji jonu Cu^{2+} na trwałość energetyczną badanych kompleksów. W tym celu wyznaczono za pomocą B3LYP/lan2DZ równowagową strukturę kompleksów TR–Cu(II)–O3–(H₂O)₄–5'-monofosforan(V) tymidyny oraz TR–Cu(II)–O4'–(H₂O)₄–5'-monofosforan(V) tymidyny (**Rys. 4.12.3.**). Dla równowagowych układów kompleksowych obliczono dokładniejsze energie oraz energię stabilizacji, stosując B3LYP/6-311++G(3df,2p). Na podstawie obliczonych energii stabilizacji (**Tabela 4.12.1.**) wnioskujemy, że kompleksy posiadające jon Cu^{2+} otoczony czterema cząsteczkami wody są stabilne energetycznie. Otrzymane wartości energii stabilizacji dla akwakompleksów przyjmują zdecydowanie mniejsze wartości, niż dla kompleksów, w których jon Cu^{2+} nie jest zhydratowany. Wynik ten pokazuje, że silne oddziaływania elektrostatyczne między jonem Cu^{2+} i molekułami wody, powodują znaczne zmniejszenie stabilności badanych kompleksów. W najtrwalszym energetycznie akwakompleksie **4.12.3.c (Rys. 4.12.3.)** długość wiązania Cu(II)–3O wynosi 3,67 Å i jest znacznie większa, niż w kompleksie TR-3-O-Cu(II)–5'-monofosforan(V) tymidyny. Dowodzi to, że jon Cu^{2+} jest słabo związany z atomem O3 TR w badanych akwakompleksach.



Rys. 4.12.3. Geometrie połączeń TR-Cu(II)-3'-O-(H₂O)₄-5'-monofosforan(V) tymidyny oraz TR-Cu(II)-4'-O-(H₂O)₄-5'-monofosforan(V) tymidyny

4.13. Oddziaływania wodorowe w kompleksach TR-H₂O

Ponieważ wiązania wodorowe niejednokrotnie determinują aktywność biologiczną oraz szereg właściwości fizykochemicznych wielu klas związków, w tym przeciwutleniaczy, zbadano oddziaływania wodorowe między molekułą wody, a grupami hydroksylowymi 4'-OH oraz 3-OH TR. Równowagowe geometrie badanych kompleksów (**Rys. 4.13.1.**), wody oraz TR otrzymano na poziomach B3LYP/6-311+G(2d,2p) oraz *ab initio* MP2(full)/6-311+G(2d,2p) w próżni oraz medium wodnym. Obliczenia optymalizacyjne w medium wodnym wykonano za pomocą modelu COSMO. Dla równowagowych geometrii kompleksów wyznaczono dokładniejsze energie przy użyciu: B3LYP/6-311G(3df,2p), B3LYP/aug-cc-pVDZ, B3LYP/aug-cc-pVTZ, B3LYP/aug-cc-pVQZ, MP2(full)/6-311+G(2d,2p), MP2(full)/6-311++G(3df,2pd), MP2(full)/aug-cc-pVDZ oraz MP2(full)/aug-cc-pVTZ. W obliczeniach energii zastosowano również metodę MP4(sdtq)/6-31+G(d,p) z uwzględnieniem wzbudzeń potrójnych. W ten sposób otrzymano duży wkład energii korelacyjno-wymiennej do energii stabilizacji kompleksów. W obliczeniach zastosowano metodę MP2 oraz MP4 w celu poprawnego opisu oddziaływań elektrostatycznych, polaryzacyjnych oraz dyspersyjnych między składnikami badanych dimerów. Należy podkreślić, że metoda DFT jest mało użyteczna do poprawnego opisu tych oddziaływań [214].

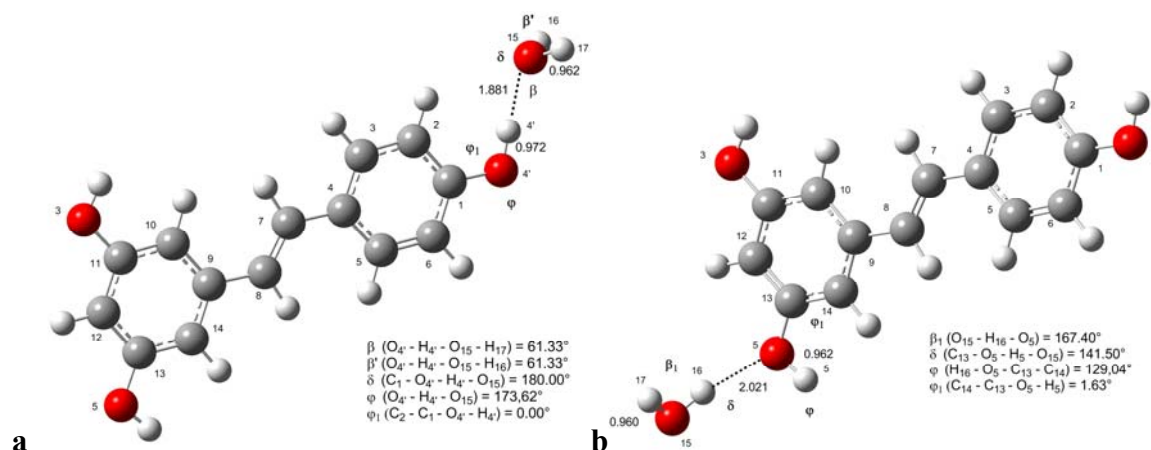


Rys. 4.13.1. Kompleksy TR z molekułą wody: a) TR-4'-OH-woda, b) TR-3-OH-woda

Energię stabilizacji obliczono, stosując następujące metody: B3LYP/6-311+G(2d,2p), B3LYP/6-311++G(3df,2p), B3LYP/aug-cc-pVDZ, B3LYP/aug-cc-pVTZ, B3LYP/aug-cc-pVQZ, MP2/(full)6-311+G(2d,2p), MP2(full)/6-311++G(3df,2p), MP2(full)/aug-cc-pVDZ oraz MP2(full)/aug-cc-pVTZ. Poprawkę BSSE obliczono w schemacie CP [194] dla każdej wartości energii stabilizacji.

Wyniki dowodzą, że TR posiada w równowagowych kompleksach otrzymanych za pomocą B3LYP/6-311+G(2d,2p) geometrię płaską (**Rys. 4.13.2.**), natomiast wyraźnie zgiętą –

za pomocą MP2(full)/6-311+G(2d,2p). Zoptymalizowane wartości kątów torsyjnych α oraz θ za pomocą MP2(full)/6-311+G(2d,2p) wynoszą odpowiednio: 28,42° oraz 31,25° dla struktury **4.13.2.a** 0,65° oraz 31,59° dla struktury **4.13.2.b**. Wartości te świadczą o tym, że szkielet *trans*-stilbenowy w badanych kompleksach jest zgięty. W związku z brakiem danych literaturowych na temat geometrii kompleksów TR-woda, nie można porównać wyników teoretycznych i eksperymentalnych. Uzyskane wyniki prowadzą do wniosku, że geometria TR w tych kompleksach jest uzależniona od zastosowanej metody.



Rys. 4.13.2. Zoptymalizowane geometrie kompleksów TR-H₂O za pomocą B3LYP/6-311+G(2d,2p)

Wyniki obliczeń, uzyskanych przy zastosowaniu B3LYP/6-311+G(2d,2p) pokazują, że atom tlenu wody tworzy w próżni wiązanie wodorowe o długości 1,880 Å z atomem H4' cząsteczki TR, natomiast w medium wodnym wiązanie to jest krótsze i jego długość wynosi 1,750 Å. Wynik ten pozostaje w zgodności z faktem, że obecność medium polarnego zwiększa trwałość badanego układu, a co za tym idzie – trwałość wiązania wodorowego. Mała odległość między akceptorem i donorem protonu dowodzi, że energia odpychania kulombowskiego stanowi główny przyczynek do całkowitej energii badanego wiązania wodorowego. Wiązanie to jest liniowe, gdyż atom tlenu wody, atom H4' TR oraz atom O4' TR leżą na jednej linii prostej. Taka geometria wiązania wodorowego zwiększa jego trwałość. Wiązanie wodorowe utworzone między atomem wodoru molekuly wody, a atomem O5 TR jest słabsze, ponieważ jego równowagowa długość otrzymana za pomocą B3LYP/6-311+G(2d,2p) wynosi 2,00 Å w próżni oraz 1,89 Å w medium wodnym. Zoptymalizowane długości analizowanych wiązań wodorowych przy użyciu MP2(full)/6-311+G(2d,2p) są mniejsze, niż otrzymane za pomocą B3LYP/6-311+G(2d,2p). Atom tlenu wody leży w płaszczyźnie pierścieni fenylo- wych TR w strukturze **4.13.2.a**, natomiast nie obserwujemy tego w przypadku struktury **4.13.2.b**. W porównaniu z izolowaną molekułą TR, długości wiązań O-H TR w kompleksie

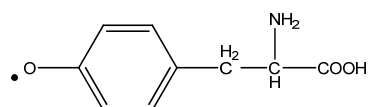
TR-woda są większe o średnio 0,8 Å. Obserwujemy wydłużenie tych wiązań dla grup OH, bezpośrednio oddziałujących z molekułą wody. Wynik ten dowodzi, że interakcja molekuł wody z TR powoduje zmniejszenie w nim stabilności wiązań O-H. Zaprezentowany model, uwzględniający bezpośrednie oddziaływanie TR z cząsteczkami wody, jest zdecydowanie bardziej realistyczny od modelu, który uwzględnia wpływ ciągłego medium wodnego na trwałość wiązań O-H.

Obliczone wartości energii stabilizacji dla badanych kompleksów dowodzą, że są one stabilne energetycznie w badanych środowiskach (**Tabele 4.13.1 i 4.13.2.**). Stosunkowo małe wartości tej energii otrzymane na poziomie metody DFT wskazują, że woda jest słabo związana z molekułą TR. Tym samym, uzyskane wyniki potwierdzają, że TR jest substancją hydrofobową. Taka właściwość może z kolei zapewniać efektywne oddziaływanie TR z błonami komórkowymi oraz niepolarnymi fragmentami lipidów i fosfolipidów. W medium wodnym obserwujemy większą stabilizację układów w porównaniu z próżnią. Zwiększenie ilości funkcji bazowych prowadzi do zwiększenia wartości energii stabilizacji. Energie stabilizacji kompleksów wyznaczone na poziomie metody MP2 są o około 3 kcal/mol większe, niż na poziomie metody DFT (**Tabele 4.13.1 i 4.13.2.**). Przeciwnostawne wyniki otrzymane za pomocą metod MP2, MP4 oraz DFT sugerują, że najprawdopodobniej energia dyspersyjna Londona oraz energia oddziaływań wodorowych przyczyniają się do wzrostu energii stabilizacji kompleksów badanych na poziomie MP2. Kolejne obliczenia zostaną wykonane w celu ilościowego określenia tych wkładów do energii stabilizacji.

Optymalna wartość całkowitej energii obliczonej za pomocą B3LYP/6-311+G(2d,2p) dla struktury **4.13.2.a** wynosi -843,0908 [hartree] oraz -843,0859 [hartree] dla struktury **4.13.2.b**. Z kolei, wartość energii otrzymana przy zastosowaniu MP2(full)/6-311+G(2d,2p) wynosi -841,2984 [hartree] dla struktury **4.13.2.a** oraz -841,2829 [hartree] dla struktury **4.13.2.b**. Otrzymane wyniki wskazują na większą stabilność energetyczną kompleksu **4.13.2.a** w porównaniu z kompleksem **4.13.2.b**. Dowodzi to, że molekuly wody w układach biologicznych oddziałują silniej z grupą 4'-OH, niż z 3-OH i 5-OH. Biorąc pod uwagę, że długość wiązania wodorowego w kompleksie **4.13.2.a** jest mniejsza, niż w kompleksie **4.13.2.b** należy przypuszczać, że znaczącą rolę w dużej stabilności kompleksu **4.13.2.a** odgrywa polaryzacja i związane za nią przeniesienie ładunku z akceptora protonu na donor protonu.

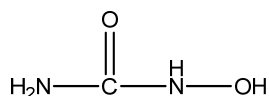
4.14. Analiza termodynamiczna rodnikowej inhibicji reduktazy rybonukleotydowej przez TR, PC oraz hydroksymocznik

Deoksyrybonukleotydy są prekursorami syntezy DNA, a ich synteza z rybonukleotydów zachodzi z udziałem kompleksu enzymatycznego reduktazy rybonukleotydowej (RR) [199]. Enzym ten u wielu organizmów różni się budową, lecz szczegółowe badania wykazały, że wszystkie formy tego enzymu realizują podobny szlak enzymatyczny, a ich struktura trzeciorzędowa wskazuje na to, że są one homologami. Badania strukturalne wykazały, że składa się ona z dwóch podjednostek dimerycznych R1 oraz R2 [199].



Rys. 4.14.1. Rodnik tyrozylowy

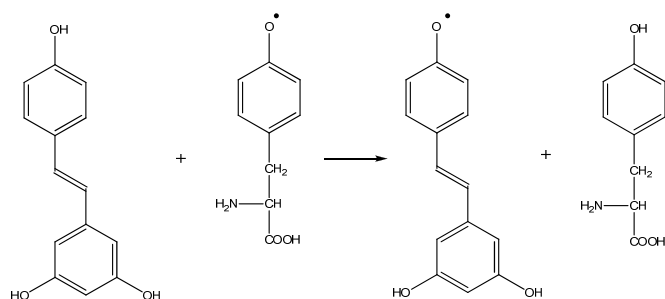
Na podstawie analizy szczegółowego mechanizmu działania RR możemy stwierdzić, że cykl katalityczny zaczyna się od transferu elektronu z reszty cysteinowej na rodnik tyrozylowy (**Rys. 4.14.1.**), w wyniku czego powstaje w podjednostce R1 bardzo reaktywny rodnik cysteinotiolowy, charakteryzujący się obecnością niesparowanego elektronu na atomie siarki [199]. Jego wyjątkowo duża reaktywność wynika z braku możliwości stabilizacji rezonansowej. Rodnik ten następnie odrywa atom wodoru z węgla C3' rybozy – powstaje rodnik węglowy, który indukuje usunięcie anionu hydroksylowego z atomu węgla C2' rybozy. Mechanizm działania tego enzymu ujawnia, że rodnik tyrozylowy odgrywa rolę inicjatora cyklu katalitycznego. Zatem, jego zmiatanie przez antyoksydanty może prowadzić do efektywnej inhibicji enzymu [216]. Wobec tego enzym ten stanowi cel działania czynników przeciwnowotworowych oraz leków, wytwarzanych w celu selektywnej inhibicji enzymu w chorej tkance nowotworowej. Badania ostatnich lat pokazały, że TR, PC, hydroksymocznik (forma amidowa) (**Rys. 4.14.2.**) oraz *p*-hydroksyanizol, to bardzo aktywne inhibitory tego enzymu [202,203], których aktywność inhibicyjna jest spowodowana zdolnością do zmiatania rodnika tyrozylowego.



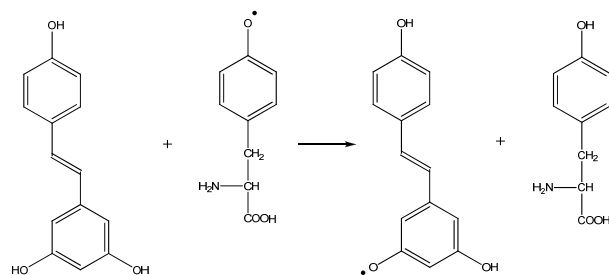
Rys 4.14.2. Hydroksymocznik

W celu wykazania rodnikowego mechanizmu inhibicji RR przez TR, wykonano obliczenia, stosując metodę DFT. Równowagowe geometrie wszystkich reagentów (TR, hydrok-

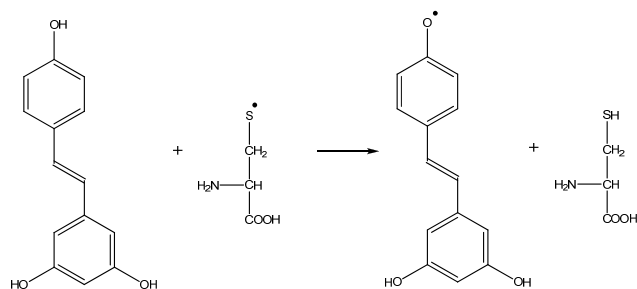
symocznik, rodnik tlenowy hydroksymocznika, rodnik tyrozylowy, tyrozynę, anion tyrozyny, anionorodnik tyrozyny, rodniki fenoksyłowe TR, rodnik cysteiniolowy, cysteina) wyznaczonych za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p). Zbadano termodynamikę reakcji przeniesienia atomu wodoru oraz elektronu z TR na rodnik tyrozylowy. Dla badanych reakcji, przedstawionych na (**Rys. 14.4.3.**), obliczono zmianę entalpii swobodnej w celu zbadania ich samorzutności termodynamicznej. Analizowano także reakcje hydroksymocznika z rodnikiem tyrozylowym, w celu porównania aktywności inhibicyjnej TR i hydroksymocznika. Bazując na fakcie, że hydroksymocznik może tworzyć kilka form tautomerycznych, zoptymalizowano ich geometrie i do rozważanych reakcji stosowano tylko formę najtrwalszą energetycznie. Ponieważ w trakcie cyklu katalitycznego tworzy się reaktywny rodnik cysteiniolowy, zbadano również reakcje TR oraz hydroksymocznika z tym rodnikiem. Zbadano również reakcje TR z anionorodnikiem tyrozynowym, gdyż w środowisku o pH zbliżonym do obojętnego, tyrozyna posiadająca punkt izoelektryczny równy $pI = 5,64$, występuje głównie w formie anionowej (zdeprotonowana grupa karboksylowa).



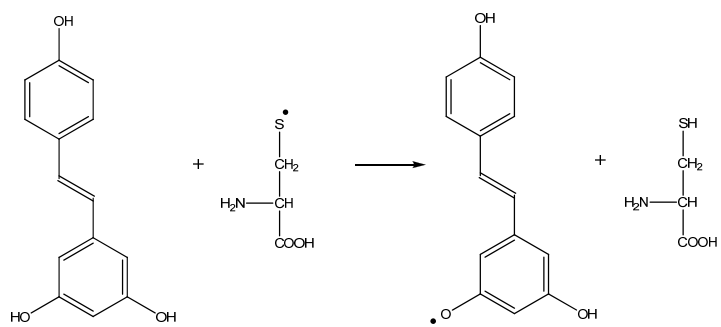
a



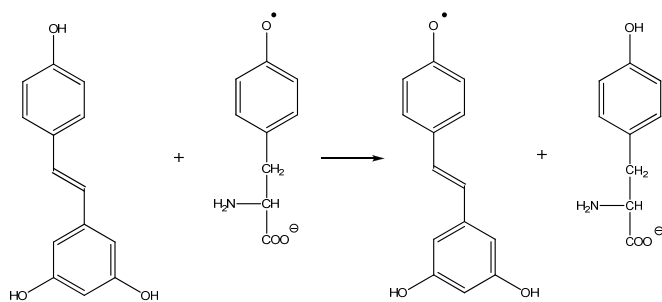
b



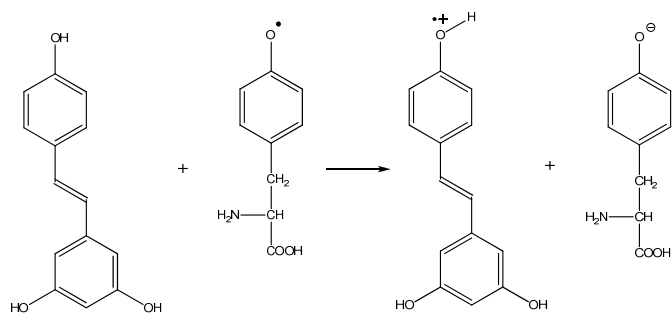
c



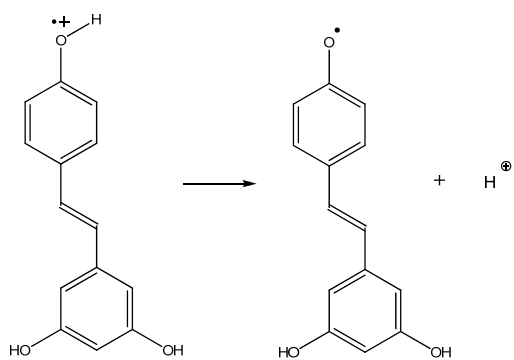
d



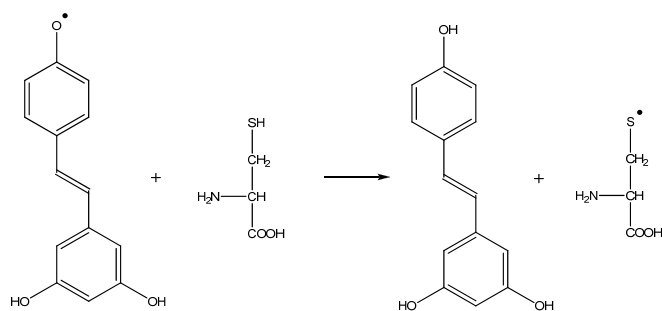
e



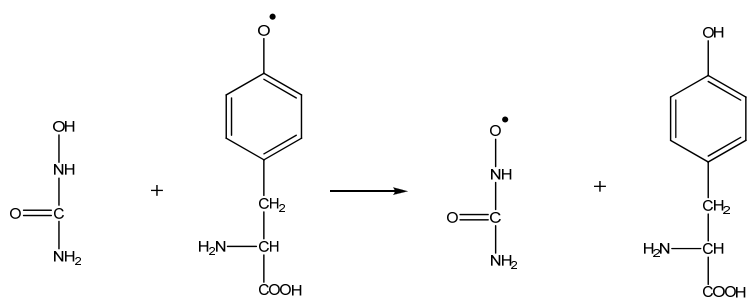
f



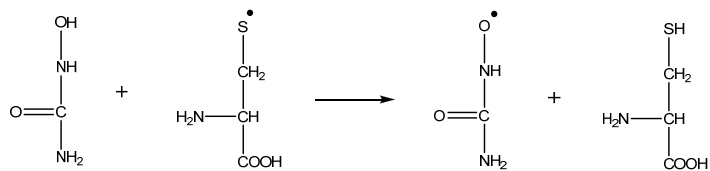
g



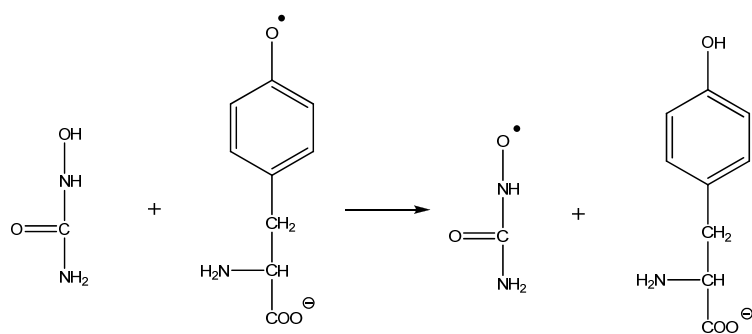
h



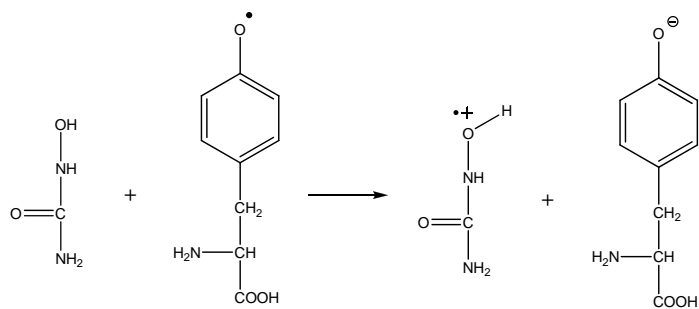
i



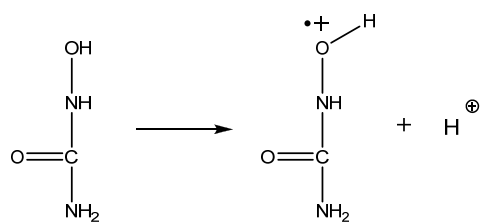
j



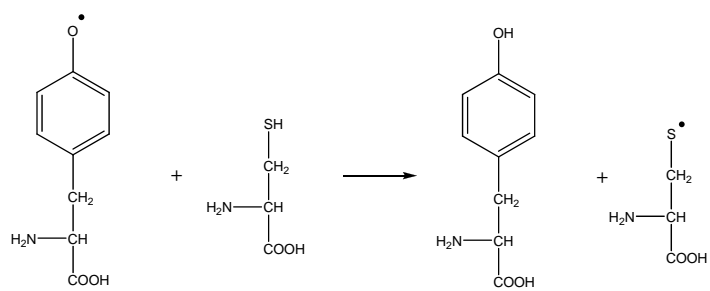
k



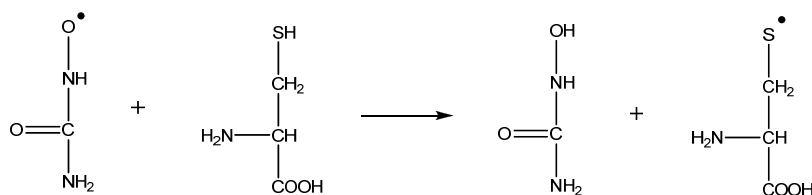
1



m



n



0

Rys. 4.14.3. Reakcje dla inhibicji rodnikowej reduktazy rybonukleotydowej: a) – h) reakcje z udziałem TR, i) – m) reakcje z udziałem hydroksymocznika, n) reakcja rodnika tyrozynowego z cysteiną i o) reakcja rodnika hydroksymocznikowego z cysteiną

Równowagowa geometria rodnika tyrozylowego posiada wyraźną strukturę semichinonową, która powoduje jego stabilizację. Analiza rozkładu gęstości spinowej w tym rodniku ujawniła, że największa gęstość spinowa jest zlokalizowana na atomie tlenu grupy hydroksylowej oraz atomach węgla pierścienia fenylowego. Spośród wszystkich optymalizowanych form tautomerycznych hydroksymocznika, najbardziej stabilna energetycznie jest forma amidowa.

Wszystkie badane reakcje, w których uczestniczy obojętna forma rodnika tyrozylowego są dozwolone termodynamicznie w badanych środowiskach (**Tabela 4.14.1.**), przy czym, w medium wodnym są zdecydowanie bardziej preferowane termodynamicznie niż w próżni. Zatem, w realnych układach biologicznych, gdzie dominuje środowisko wodne, inhibicja oparta na mechanizmie rodnikowym jest termodynamicznie dozwolona. Reakcja TR z anionorodnikiem tyrozylowym w próżni nie jest preferowana termodynamicznie, podczas gdy w medium wodnym jest dozwolona. Najprawdopodobniej silne oddziaływanie medium polarnego z ujemnie naładowanymi anionorodnikami powoduje zmniejszenie zmiany entalpii swobodnej reakcji. Reakcja grupy 4'-OH TR z rodnikiem tyrozylowym jest bardziej preferowana termodynamicznie niż ta, w której bierze udział grupa 3-OH. Jest to wynikiem większej stabilizacji rezonansowej 4'-O-rodnika niż 3-O-rodnika. Ponadto, reakcja hydroksymocznika w formie amidowej z rodnikiem tyrozylowym jest bardziej uprzywilejowana termodynamicznie, niż reakcja TR z tym rodnikiem. Stosunkowo mała wielkość cząsteczki hydroksymocznika i obecność w niej grupy hydroksyamidowej wydaje się być głównym czynnikiem, zmniejszającym wartość zmiany entalpii swobodnej reakcji hydroksymocznika z rodnikiem tyrozylowym.

W pracy [202] porównano szybkość zaniku rodnika tyrozylowego w obecności TR oraz hydroksymocznika. Badania kinetyczne pokazały, że w obecności TR szybkość zaniku jest zdecydowanie większa niż w przypadku hydroksymocznika. Należy podkreślić, że otrzymane wyniki obliczeń nie stoją w sprzeczności z wynikami otrzymanymi w niniejszej pracy, gdyż

pokazują aspekt termodynamiczny procesu inhibicji, a wyniki eksperymentalne – kinetyczny. W związku z tym problemem, konieczne będzie zbadanie kinetyki tych reakcji i wyznaczenie geometrii kompleksów aktywnych.

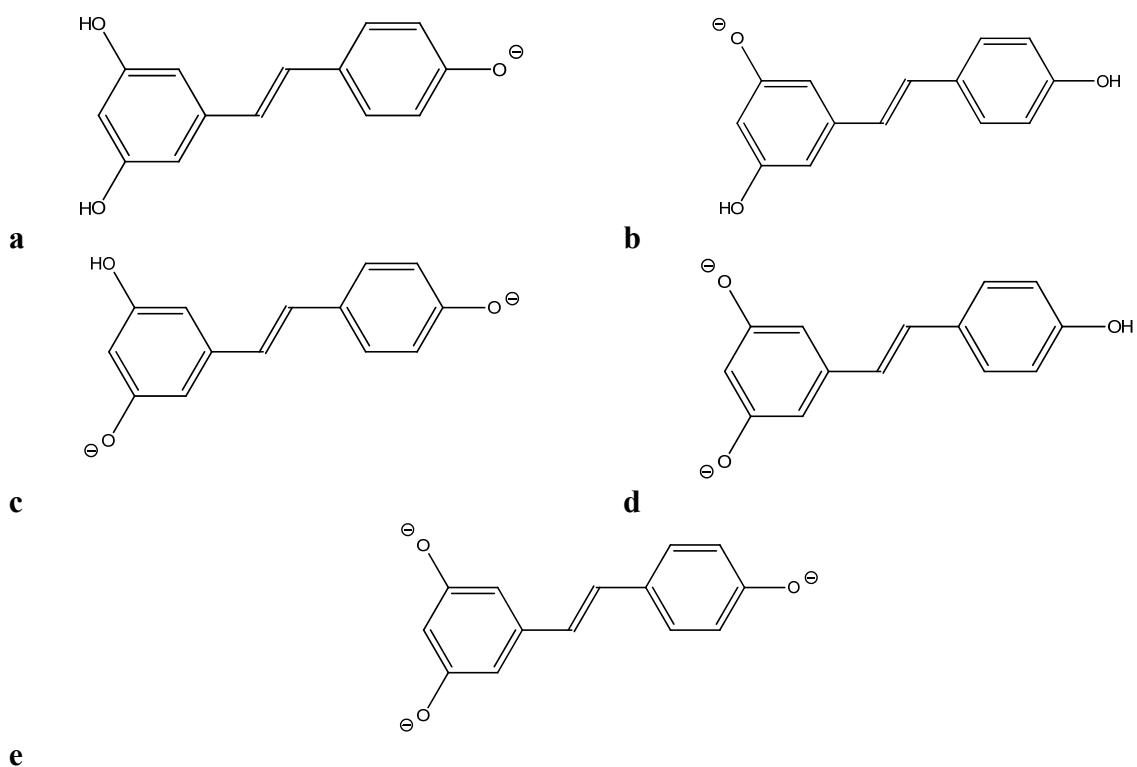
Reakcje TR z rodnikiem tyrozylowym oraz rodnikiem cysteinotiolowym charakteryzują się zbliżoną wartością zmiany entalpii swobodnej (**Tabela 4.14.1.**). Wyniki te sugerują, że TR może efektywnie zmiatać zarówno rodnik tyrozylowy, jak i cysteinotiolowy. Taka dwukierunkowość może być przyczyną niezwykle dużego stopnia hamowania aktywności badanego enzymu przez TR. Wyniki pokazują, że TR może być potencjalnym chemoterapeutykem, który efektywnie hamuje proces powstawania deoksyrybonukleotydów w komórkach nowotworowych oraz wirusach zawierających DNA.

Analiza budowy rodników fenoksylowych TR oraz 4'-O-rodnika tyrozyny uwidacznia ich duże podobieństwo strukturalne. To z kolei sugeruje, że powstały rodnik TR może zastąpić rodnik tyrozylowy w centrum aktywnym RR, co prowadziłoby do inhibicji kompetycyjnej enzymu. Na podstawie obliczonej wartości zmiany entalpii swobodnej reakcji 4'-O-rodnika TR z cysteiną wynika, że jest ona preferowana termodynamicznie w medium wodnym. Wynik ten sugeruje, że inhibicja reduktazy rybonukleotydowej może być kompetycyjna.

4.15. Zależność struktura – aktywność antyoksydacyjna TR w próżni, medium wodnym i etanolowym

Równowagowa geometria TR oraz jego anionów tlenowych była wyznaczona za pomocą metod *restricted* B3LYP/6-311G(d,p) oraz *restricted* B3LYP/6-311+G(d,p), natomiast równowagowa struktura 4'-O-rodnika oraz kationorodnika TR była wyznaczona przy zastosowaniu metod *unrestricted* B3LYP/6-311G(d,p) i *unrestricted* B3LYP/6-311+G(d,p). Obliczenia wykonano zarówno dla izolowanej molekuly TR, jak i w obecności medium wodnego i etanolowego. Zoptymalizowano geometrię następujących form anionowych TR: 4'-O-monoanionu, 5-O-monanionu, 4',3-O-dianionu, 3,5-O-dianionu oraz 4',3,5-trianionu (**Rys. 4.15.1.**). Do obliczeń optymalizacyjnych stosowano rodnik fenoksyłowy powstały przez usunięcie wodoru z grupy 4'-OH, gdyż jest ona najaktywniejsza biologicznie [61]. Rozkład konturu gęstości prawdopodobieństwa orbitalu HOMO w TR oraz gęstości spinowej w 4'-O-rodniku wygenerowano dla równowagowej geometrii TR i jego 4'-O-rodnika fenoksyłowego. Wpływ efektów solwatacyjnych na aktywność przeciwutleniającą badano za pomocą modelu C-PCM. W obliczeniach zastosowano następujące wartości liczbowe entalpii, entalpii swobodnej oraz metody ich wyznaczania [189]:

1. Entalpia atomu wodoru w próżni: $H_H = -0,49764$ [hartree].
2. Entalpia atomu wodoru w medium wodnym: suma entalpii atomu H w próżni i entalpii hydratacji wynoszącej $-4,00$ [kJ/mol].
3. Entalpia atomu wodoru w medium etanolowym: suma entalpii atomu wodoru w próżni oraz entalpii solwatacji w słabo polarnych rozpuszczalnikach (5 kJ/mol).
4. Entalpia swobodna anionu hydroksylowego wynosiła $-75,771707$ [hartree], $-75,914631$ [hartree] oraz $-75,910527$ [hartree], odpowiednio w próżni, medium wodnym oraz etanolowym. Wartości te otrzymano za pomocą B3LYP/6-311+G(d,p).
5. Entalpia swobodna jonu oksoniowego (H_3O^+) wynosiła $-76,715998$ [hartree], $-76,859623$ [hartree] oraz $-76,855477$ [hartree], odpowiednio w próżni, medium wodnym oraz etanolowym. Wartości te otrzymano za pomocą B3LYP/6-311+G(d,p).
6. Entalpia swobodna molekuly wody wynosiła $-76,454816$ [hartree], $-76,470024$ [hartree] oraz $-76,469525$ [hartree], odpowiednio w próżni, medium wodnym oraz etanolowym. Wartości te otrzymano stosując B3LYP/6-311+G(d,p).

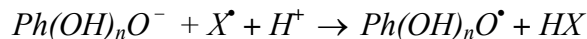
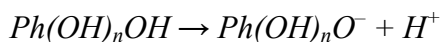


Rys. 4.15.1. Formy anionowe TR: a) 4'-O-monoanion, b) 5-O-monanion, c) 4',3-O-dianion, d) 3,5-O-dianion oraz e) 4',3,5-trianion

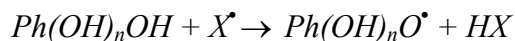
W celu zbadania aktywności przeciwutleniającej TR, obliczono następujące deskryptory aktywności antyoksydacyjnej: PDE, AIP, BDE, gęstość spinową oraz energię poziomu HO-MO. W oparciu o wyznaczone parametry antyoksydacyjne można było stwierdzić, który z

podanych niżej mechanizmów zmiatania wolnych rodników jest najbardziej preferowany przez TR:

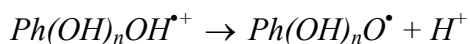
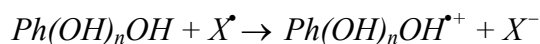
1. Mechanizm SPLET (*Sequential Proton Loss Electron Transfer Mechanism*)



2. Mechanizm HAT (*Hydrogen Transfer Mechanism*)



3. Mechanizm ET-PT (*Electron-Proton Transfer Mechanism*)

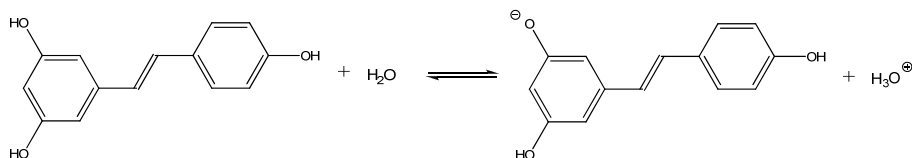
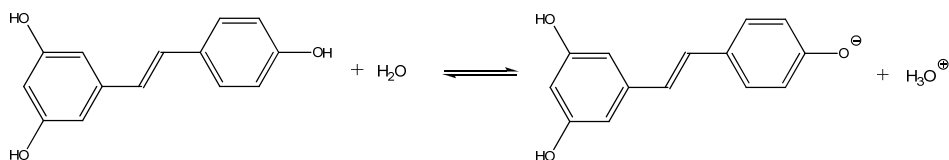
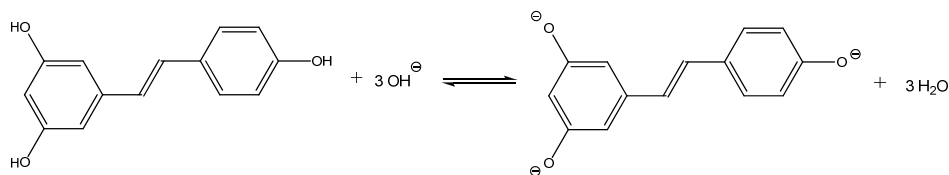


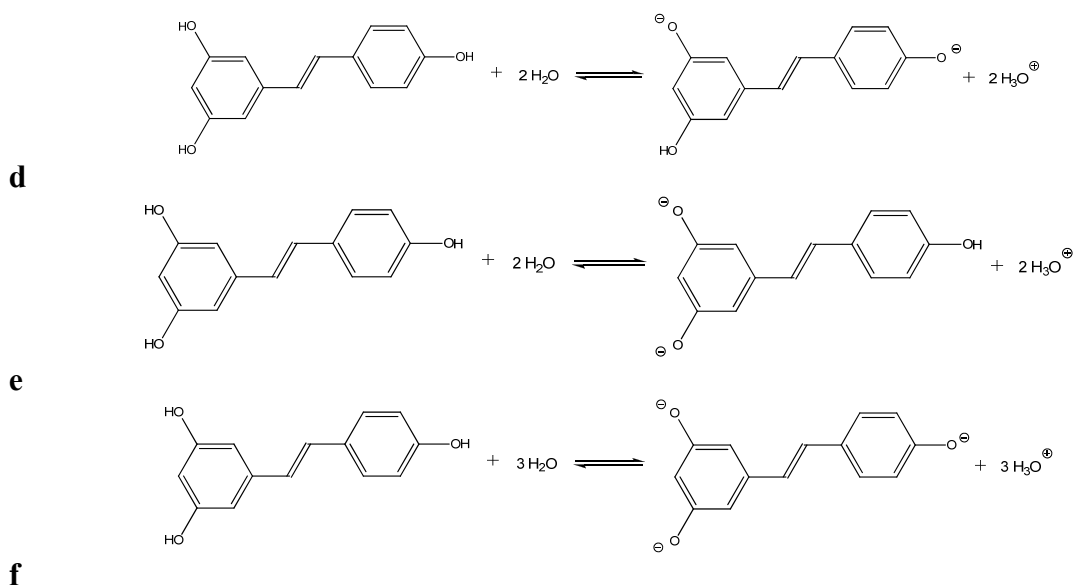
W podanych mechanizmach $Ph(OH)_nOH$ oznacza dowolny polifenol. Entalpię substratów oraz produktów wyznaczono z następującej relacji:

$$H_{total} = E_0 + ZPE + \Delta H_{trans} + \Delta H_{rot} + \Delta H_{vib} + RT \quad (4.15.1)$$

gdzie E_0 jest energią elektronową, ZPE – energią zerowego punktu, natomiast ΔH_{trans} , ΔH_{rot} , oraz ΔH_{vib} oznaczają odpowiednio translacyjny, rotacyjny oraz wibracyjny przyczynek do całkowitej entalpii.

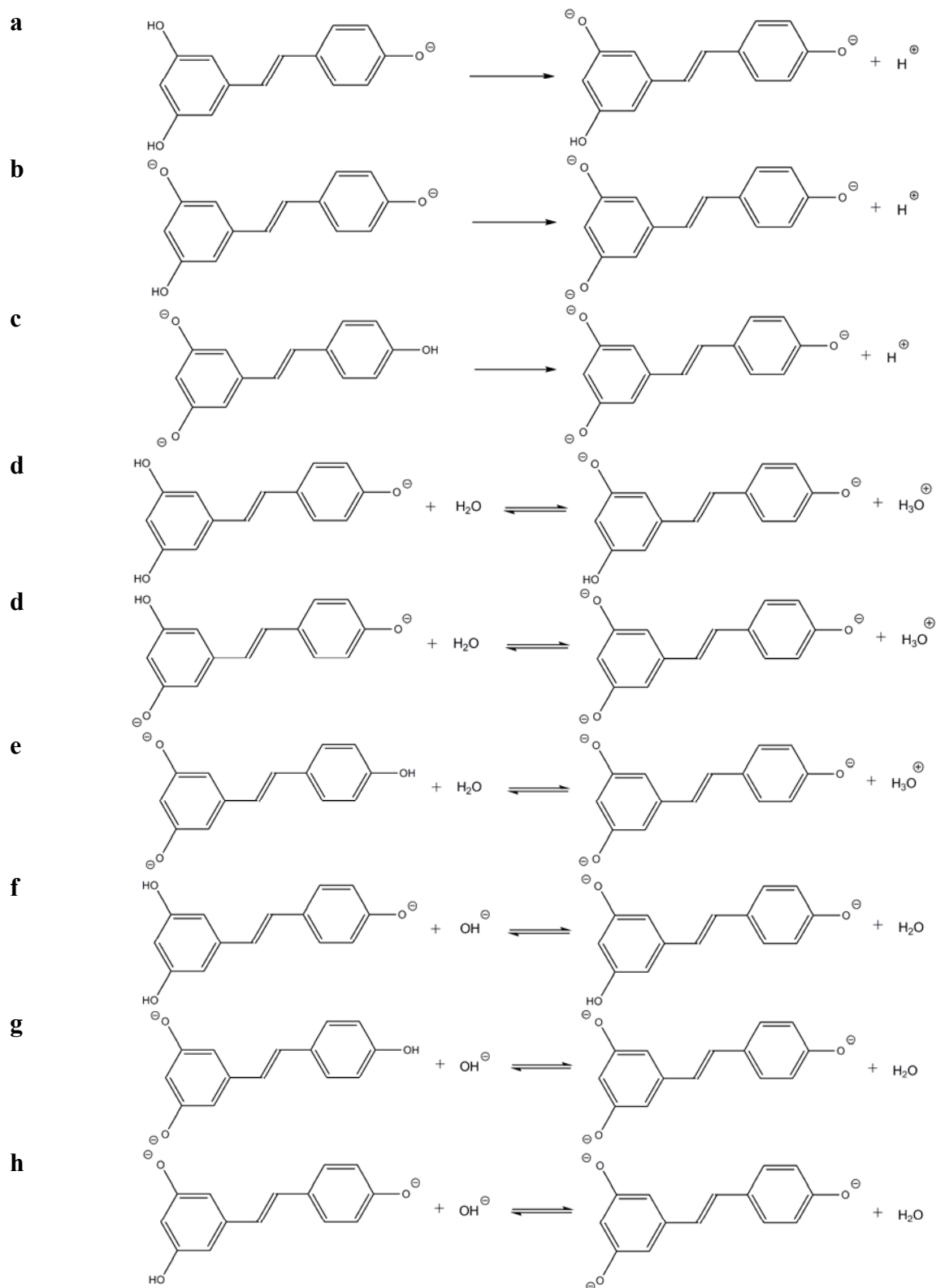
Uzyskane wyniki (**Tabela 4.15.1.**) pokazują, że oderwanie wszystkich protonów z grup OH TR przez molekuly wody jest niekorzystne termodynamicznie, podczas gdy proces tworzenia trianionu w reakcji TR z anionem wodorotlenkowym jest termodynamicznie możliwy [189]. W medium polarnym zmiany entalpii swobodnej reakcji przyjmują mniejszą wartość, niż w próżni. W związku z tym, tworzenie trianionu w medium polarnym jest bardzo korzystne termodynamicznie.





Rys. 4.15.2. Reakcje TR z wodą i anionem wodorotlenkowym

W badanych środowiskach PDE dla wiązania 4'-O-H ma mniejszą wartość niż dla wiązania 3-O-H (**Tabele 4.15.2 i 4.15.3.**). Można stąd wnioskować, że grupa 4'-OH jest bardziej kwasowa, niż pozostałe grupy hydroksylowe. W wodzie zdolności protodonorowe TR są nieznacznie większe niż w etanolu. Uzyskany wynik potwierdza obserwację eksperymentalną, poczynioną przez Fukuharę i wsp. [61], którzy stwierdzili, że grupa 4'-OH TR jest najbardziej reaktywna i wnosi największy wkład do jego aktywności biologicznej. Bardzo duże wartości PDE świadczą o słabych zdolnościach TR do odczepiania protonu i, tym samym, o niskiej jego kwasowości. Ponadto, wartości PDE wskazują, że mechanizm SPLET raczej nie jest preferowany dla TR. Otrzymane przez López-Nicolás i wsp. [195] wartości stałych deprotonacji TR $pK_{a1} = 8,8$, $pK_{a2} = 9,8$, $pK_{a3} = 11,4$ potwierdzają, że TR jest bardzo słabym kwasem, którego moc jest nieznacznie większa od mocy najprostszego fenolu (hydroksybenzenu). Wyniki dowodzą, że TR w mediach polarnych jest bardziej zdolny do dysocjacji protonowej, niż w próżni [189]. Jest to spowodowane silnym elektrostatycznym oddziaływaniem medium polarnego z polarnym wiązaniem O-H. W wyniku tego oddziaływania następuje osłabienie tego wiązania i jest ono bardziej podatne na rozpad heterolityczny. W badanych środowiskach 4',3-O-dianiony oraz 3,5-O-dianiony są bardziej podatne na oddawanie protonu niż 4'-O-anion (**Tabela 4.15.4.**) [189]. Ponadto, 3,5-O-dianion jest bardziej podatny na dysocjację protonową, niż 4',3-O-dianion w analizowanych mediach.



Rys. 4.15.3. Reakcje form anionowych TR z wodą i anionem wodorotlenkowym oraz reakcje dysocjacji protonowej anionów

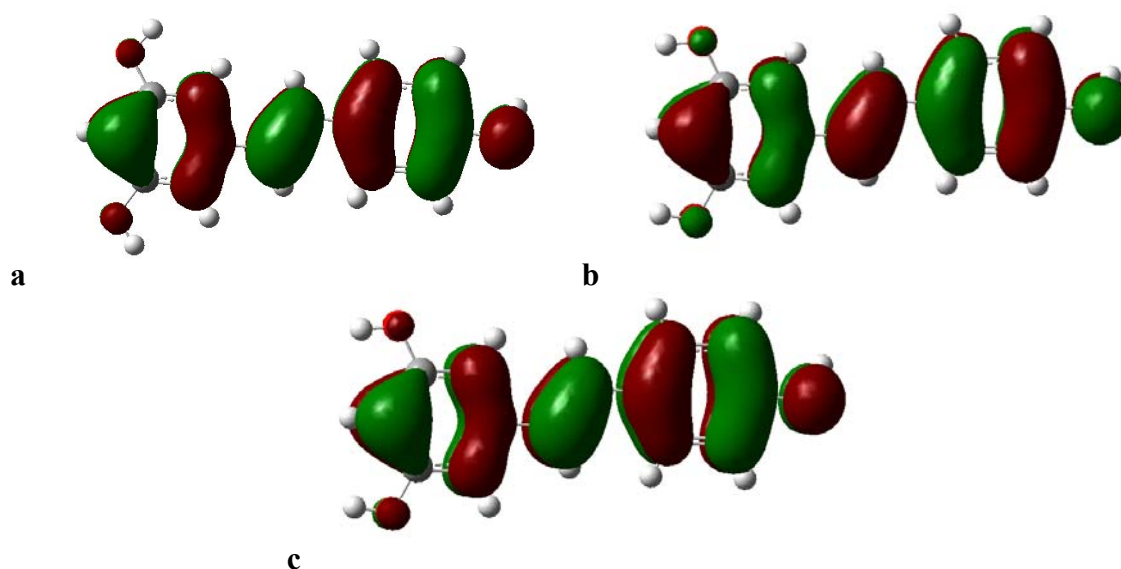
Reakcje monoanionów i dianionów TR z molekułą wody (**Rys. 4.15.3.**) są niekorzystne termodynamiczne (**Tabela 4.15.1.**) [189], natomiast reakcje form anionowych TR z jonami

wodorotlenkowymi są termodynamicznie preferowane we wszystkich mediach, a w szczególności w medium wodnym. Wartości ΔG dla reakcji monoanionów oraz dianionów z molekułą wody w medium wodnym są znacznie mniejsze niż w medium etanolowym. Rezultat ten dowodzi, że transfer protonu z monoanionu oraz dianionu na jon wodorotlenkowy jest bardziej preferowany w medium wodnym, niż etanolowym, gdyż woda posiada większy moment dipolowy niż etanol. Podsumowując, należy stwierdzić, że 4'-O-anion ma większe zdolności do oddawania protonu, niż odpowiednie dianiony oraz, że aktywność przeciwutleniająca form anionowych TR może być wyjaśniona w oparciu o mechanizm transferu protonu [189].

Obliczone wartości BDE wiązania 4'O-H oraz AIP za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) są praktycznie identyczne w medium wodnym oraz etanolowym (**Tabela 4.15.2.**) [189]. Otrzymany wynik dowodzi, że w tych mediach zdolność TR do oddawania wodoru jest bardzo podobna. Natomiast w wodzie TR jest bardziej podatny na jonizację niż w etanolu. Po uwzględnieniu w obliczeniach bazy 6-311+G(d,p), wzbogaconej o funkcje dyfuzyjne, wartości AIP w wodzie są mniejsze, niż etanolu, natomiast BDE są większe w medium wodnym niż w etanolowym (**Tabela 4.15.3.**). Wynik ten pokazuje, że woda bardziej stabilizuje wiązanie 4'O-H i ułatwia transfer elektronu. Jako że zastosowana baza 6-311+G(d,p) jest bardziej wiarygodna do opisu struktury elektronowej badanych układów od bazy 6-311G(d,p), można przypuszczać, że dla TR w medium etanolowym jest bardziej preferowany mechanizm HAT, niż w wodnym. W związku z tym, że wartości BDE są znacznie mniejsze niż AIP i PDE, należy wnioskować, że TR głównie zmiata wolne rodniki zgodnie z mechanizmem HAT w rozważanych mediach. Porównując otrzymane wartości BDE na poziomie B3LYP/6-311G(d,p) w próżni i medium wodnym z wynikami otrzymanymi przez Leopoldini i wsp. [160] zauważamy, że w ich pracy parametr ten przyjmuje większe wartości. Jest to spowodowane zastosowaniem przez nich bardziej złożonej bazy funkcyjnej 6-311++G(3df,2p) oraz modelu solwacyjnego SCRF-PCM.

W środowiskach polarnych wartości AIP zmniejszają się o około 39 kcal/mol w stosunku do fazy gazowej [189]. Natomiast w przypadku BDE ta różnica jest bardzo mała. Wartości BDE w etanolu i wodzie są nieznacznie większe w porównaniu z próżnią; BDE ma wartość o około 2 kcal/mol większą w mediach polarnych niż w próżni. Wynik ten może być przypisany większej stabilizacji badanych układów w medium polarnym i wskazuje na to, że w niepolarnych mediach TR jest efektywnym antyoksydantem, działającym zgodnie z mechanizmem HAT, a w mediach polarnych zgodnie z mechanizmem ET.

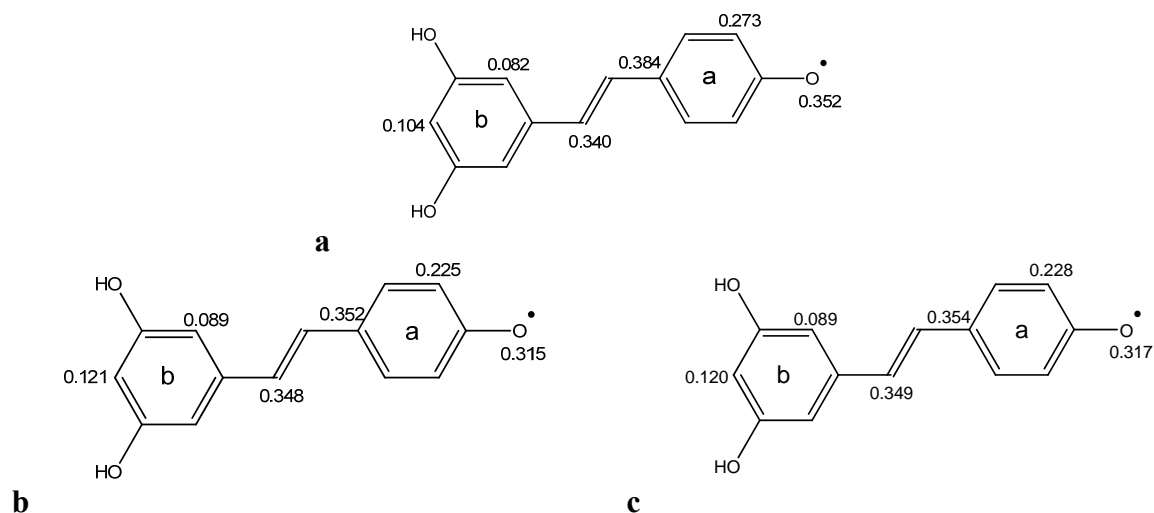
W TR kontur orbitalu HOMO zdelokalizowany jest wzdłuż całego szkieletu *trans*-stilbenowego (**Rys. 4.15.4.**) [189]. Rozkład ten pozwala stwierdzić, że grupa 4'-O-H oraz wiązanie winylowe są szczególnie mocno podatne na atak rodników w układach biologicznych. Tak mocno zaznaczona delokalizacja orbitalu HOMO jest spowodowana obecnością wiązania winylowego. Obliczone wartości energii orbitalu HOMO przy użyciu B3LYP/6-311G(d,p) w próżni, medium wodnym oraz etanolowym wynoszą odpowiednio: -5,675 eV, -5,564 eV, -5,566 eV. Wartość energii orbitalu HOMO w próżni jest o około 2,5 kcal/mol mniejsza niż w mediach polarnych. Wartości te oznaczają, że TR jest nieznacznie bardziej podatny na jonizację w wodzie niż w etanolu.



Rys. 4.15.4. Trójwymiarowy rozkład orbitalu HOMO dla TR w: a) próżni b) medium wodnym oraz c) medium etanolowym

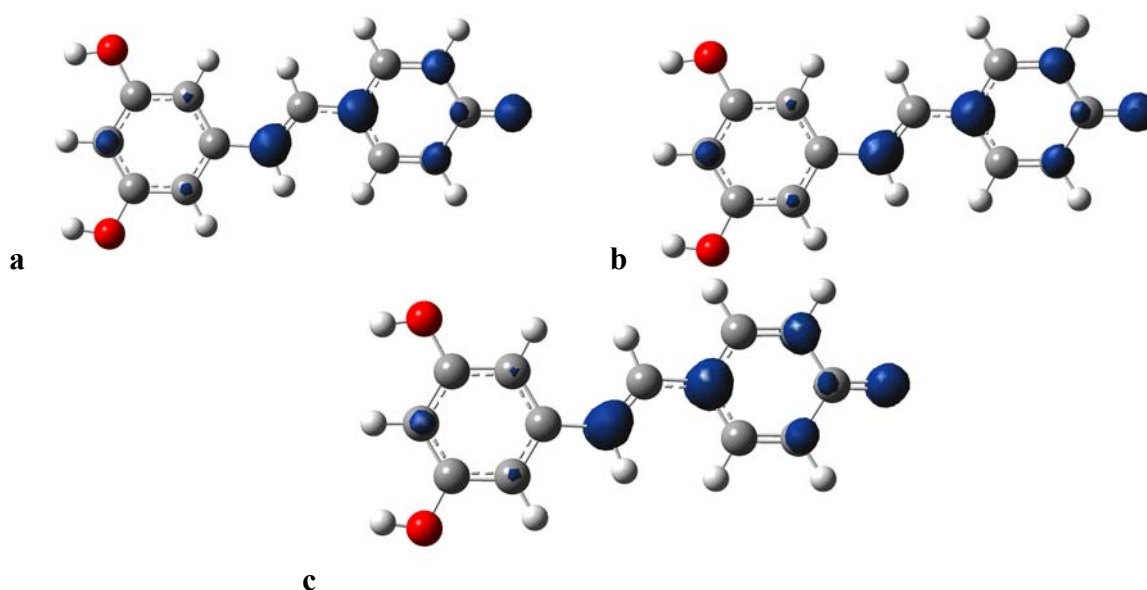
Zdolność TR do zmiatania wolnych rodników może być również wyjaśniona w oparciu o rozkład gęstości spinowej w 4'-O-rodniku fenoksylowym. Analiza otrzymanych rozkładów gęstości spinowej w 4'-O-rodniki TR (**Rys. 4.15.5. i 4.15.6**) pokazuje, że największa gęstość jest na atomie 4'-O, atomach pierścienia **a** oraz w pobliżu wiązania winylowego [189]. Otrzymane wyniki dowodzą, że w badanych środowiskach największy przyczynek do całkowitej gęstości spinowej pochodzi od pierścienia **a**, natomiast wkład od pierścienia **b** jest wyraźnie mniejszy. Różnice w wartościach gęstości spinowej pochodzącej od pierścienia **a** są większe, niż od pierścienia **b**, a gęstość spinowa na atomie 4'-O jest wyraźnie mniejsza w mediach polarnych niż w próżni. Mniejsze wartości obliczonej gęstości spinowej w wodzie i w etanolu dowodzą, że środowiska te silniej stabilizują 4'-O- rodniki niż próżnia [189]. Małe różnice w wartościach gęstości spinowej w medium wodnym oraz etanolowym są związane z

małymi różnicami wartości całkowitej energii 4'-O-rodnika w wodzie i w etanolu. Porównując rozkład gęstości spinowej przedstawionej na **Rys. 4.15.5.** i **4.15.6.** można stwierdzić, że rozkłady te pozostają ze sobą w dużej zgodności.



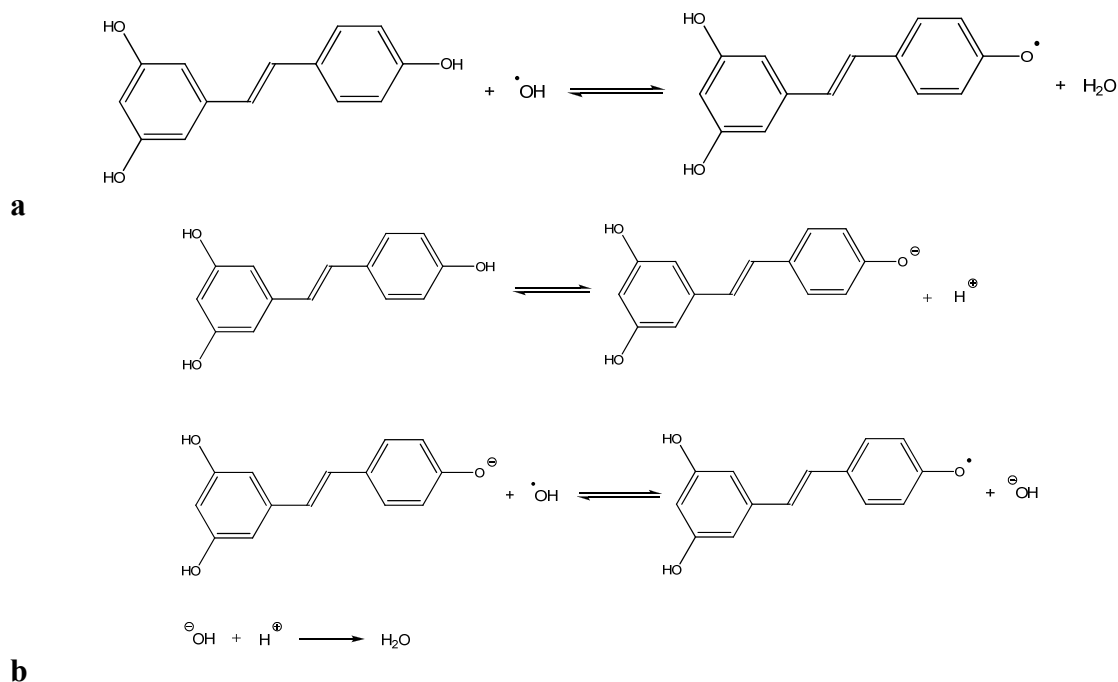
Rys. 4.15.5. Obliczone na poziomie B3LYP/6-311G(d,p) gęstości spinowe na atomach 4'-O-rodnika TR w: a) próżni, b) medium wodnym i c) etanolowym

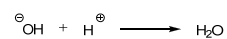
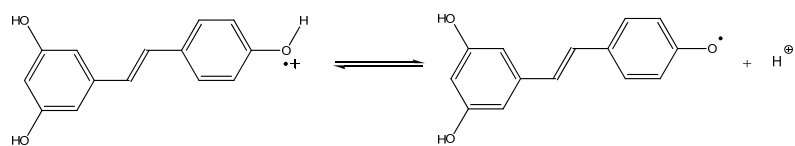
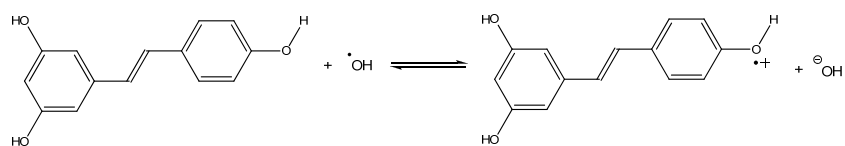
W celu zbadania wpływu geometrii szkieletu *trans*-stilbenowego TR na trwałość wiązania 4'-O-H obliczono wartości BDE dla geometrii TR, znajdujących się lokalnych minimach energetycznych na PES wygenerowanym na poziomie B3LYP/6-311G(d,p). Powierzchnie te wygenerowano zarówno dla obojętnej molekuly, jak i 4'-O-rodnika fenoksyłowego. Otrzymane PES przedstawiają zależność energii od wartości kątów torsyjnych α oraz θ . W każdym punkcie PES geometrie badanych układów były całkowicie optymalizowane i obliczane były dla nich częstości drgań harmoniczných. Wspomniane kąty torsyjne nie podlegały optymalizacji. Dla każdej geometrii TR i odpowiadającej jej geometrii 4'-O-rodnika na PES obliczano całkowite wartości entalpii (z uwzględnieniem poprawki termicznej) na poziomie B3LYP/6-311++G(d,p). Uzyskane wyniki (**Tabela 4.15.6**) dowodzą, że wartość BDE wiązania 4'-O-H jest najmniejsza dla konformacji płaskiej TR. W związku z tym, TR w takiej konformacji wykazuje największą zdolność do oddawania wodoru i, tym samym, jest najsilniejszym przeciwutleniaczem. Należy przypuszczać, że osłabienie koniugacji między pierścieniami aromatycznymi w zgiętej konformacji TR, jak i jego 4'-O-rodniku wnoszą największy wkład do wzrostu BDE wiązania 4'-O-H.



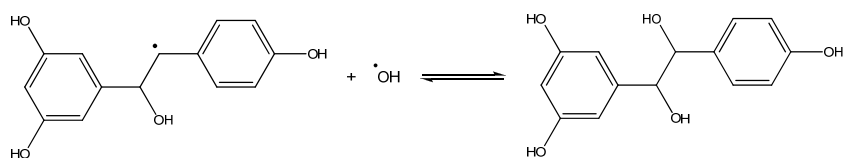
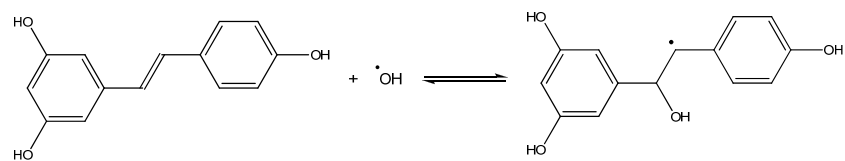
Rys. 4.15.6. Trójwymiarowy rozkład gęstości spinowej otrzymany za pomocą B3LYP/6-311+G(d,p) w 4'-O-rodniku TR w: a) próżni b) medium wodnym c) oraz medium etanolem

Z uwagi na to, że antyoksydanty mogą zmiatać wolne rodniki zgodnie z różnymi mechanizmami [204], zaproponowano nowe mechanizmy reakcji TR z rodnikiem hydroksylowym, pokazane na **Rys. 4.15.7**. W celu zbadania samorzutności tych reakcji w warunkach standardowych, obliczono dla nich na poziomie B3LYP/6-311+G(d,p) zmianę entalpii swobodnej. Obliczano ją dla reakcji sumarycznej (reakcji wypadkowej) zakładając, że reakcje elementarne w przedstawionych mechanizmach są procesami równowagowymi.

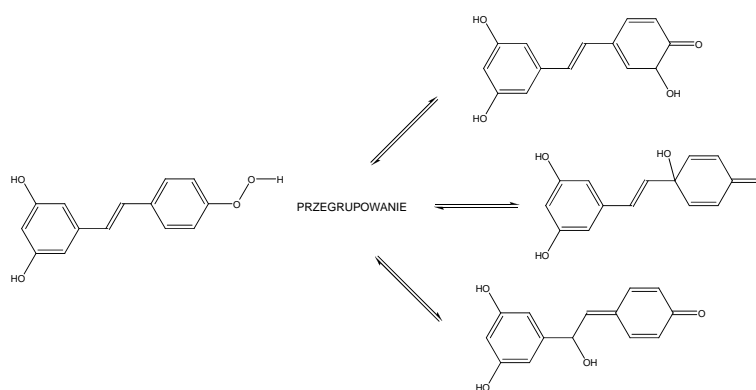
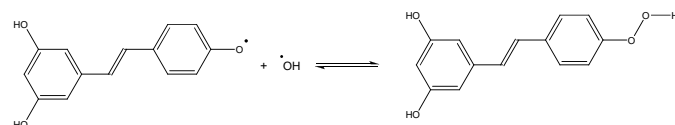
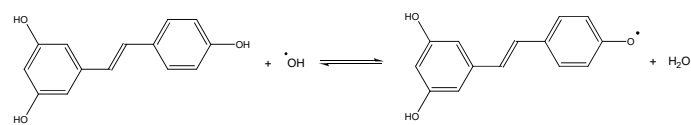




c



d



e

Rys. 4.15.7. Mechanizmy reakcji TR z rodnikiem hydroksylowym: a) HAT, b) protonowy, c) ET, d) z insercją do wiązania winylowego e) z przegrupowaniem

Analiza wartości ΔG pokazuje (**Tabela 4.15.5.**), że spośród wszystkich mechanizmów, mechanizm **4.15.7.d** jest najbardziej preferowany termodynamicznie w badanych środowiskach. Zgodnie z nim, dwa rodniki hydroksylowe ulegają addycji do wiązania winylowego. Taka orientacja addycji może być wyjaśniona w oparciu o wartości funkcji Fukui, wyznaczone dla atomów węgla i wodoru wiązania winylowego oraz o rozkład molekularnych potencjałów elektrostatycznych. W kolejnym etapie obliczeń zostaną wyznaczone wartości tych indeksów reaktywności. Należy podkreślić, że wnioskowanie o preferowanym mechanizmie reakcji jedynie na podstawie danych termodynamicznych jest niewystarczające, gdyż kinetyka procesu odgrywa również ogromną rolę w badaniu mechanizmu reakcji. Zatem, badania kinetyki wspomnianych reakcji wydają się być w pełni zasadne.

Zbadano też termodynamikę reakcji różniących się miejscem przyłączenia dwóch rodników hydroksylowych do pierścieni aromatycznych TR. Obliczona wartość ΔG równa -63,110 kcal/mol wskazuje, że najbardziej preferowana jest addycja rodnika hydroksylowego do węgla C6 pierścienia fenyłowego **a** i węgla C4. Widzimy dużą różnicę w wartościach ΔG przy przejściu z fazy gazowej do medium wodnego. Wynik ten może być wytłumaczony w oparciu o fakt, że w tym mechanizmie biorą udział aniony, które silnie oddziałują elektrostatycznie z medium wodnym. Mechanizm protonowy jest najmniej preferowany termodynamicznie, ponieważ ΔG dla reakcji tego mechanizmu ma największą wartość. Najprawdopodobniej jest to spowodowane małą zdolnością TR do dysocjacji jonowej.

Obliczona wartość ΔG dla mechanizmu z przegrupowaniem dowodzi, że jest on również preferowany termodynamicznie. Obliczone wartości częstości dla równowagowej geometrii produktu pośredniego, który ulega przegrupowaniu i posiada charakterystyczne ugrupowanie wodoronadtlenkowe wskazują na brak częstości urojonej. Wnioskujemy stąd, że związek ten stanowi trwały produkt przejściowy (**Rys. 4.15.7.e**). Otrzymane wyniki rzucają nowe światło na proces zmiatania wolnych rodników przez TR, który działa synergistycznie, zgodnie z postulowanymi mechanizmami. W efekcie ta wielokierunkowa aktywność sprawia, że TR jest bardzo silnym przeciwutleniaczem w układach biologicznych.

4.16. Zależność struktura – aktywność antyoksydacyjna hydroksylowych pochodnych TR i CR

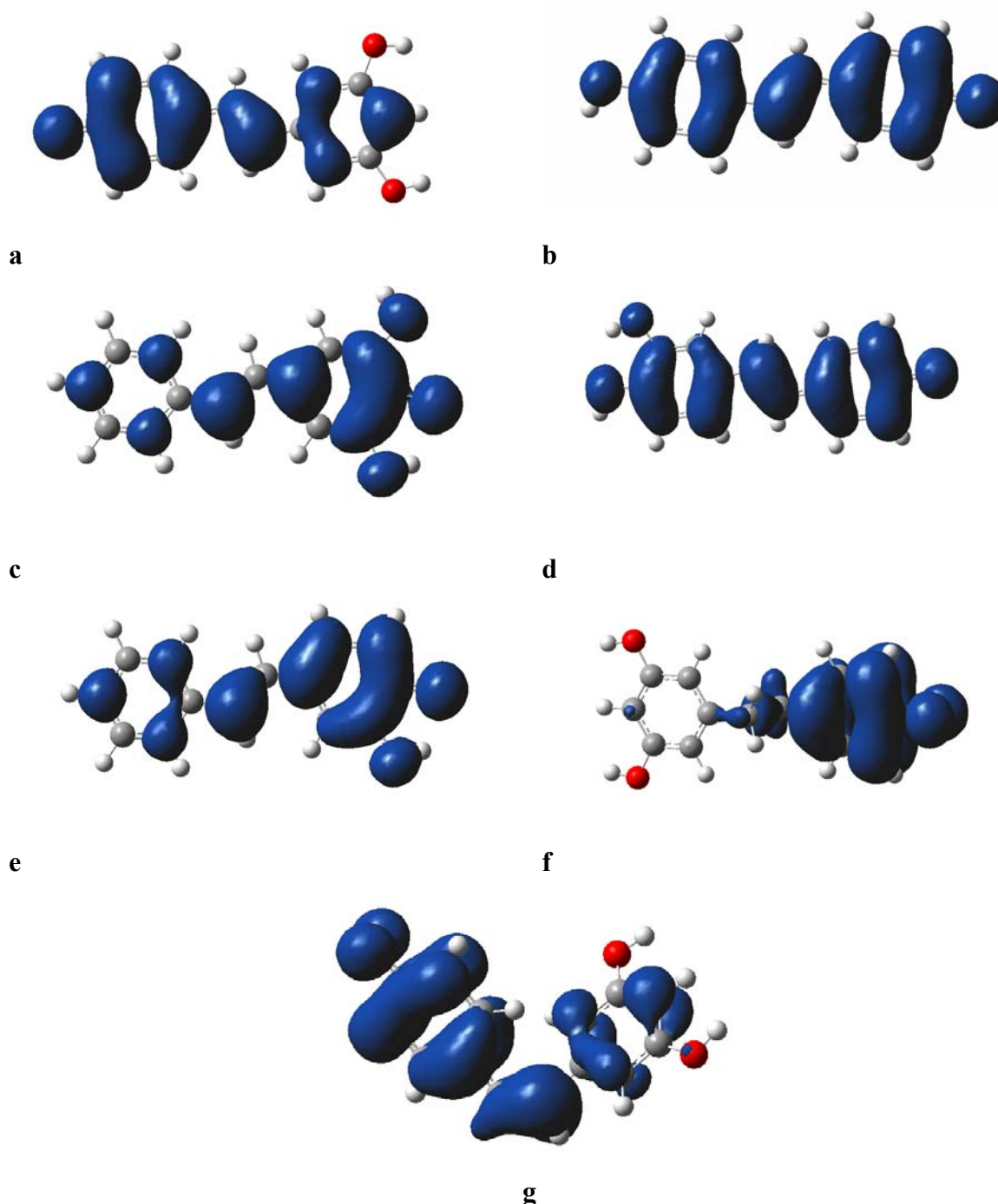
Wyznaczono parametry antyoksydacyjne (BDE i AIP) na poziomie B3LYP/6-311G(d,p) dla równowagowych geometrii następujących polifenoli: TR, CR, *trans*-4,4'-dihidroksystilbenu (*trans*-4,4'-DHS), *trans*-3,4-dihidroksystilbenu (*trans*-3,4-DHS), *trans*-

3,4,4'-trihydroksystilbenu (*trans*-3,4,4'-THS), *trans*-3,4,5-trihydroksystilbenu (*trans*-3,4,5-THS) and α,β -dihydro-3,4',5-trihydroksystilbenu (α,β -dihydro-3,4',5-THS) (**Rys. 1.1.1. a i b** oraz **4.4.1.**) [187]. Obliczenia wykonano również dla stereoizomerów *cis*, w celu zbadania wpływu izomerii geometrycznej na aktywność antyoksydacyjną. Parametry antyoksydacyjne w medium wodnym były wyznaczane za pomocą modelu C-PCM.

Obliczone wartości AIP oraz BDE dla *trans*-4,4'-DHS, *trans*-3,4-DHS, *trans*-3,4,4'-THS oraz *trans*-3,4,5-THS są mniejsze niż dla TR (**Tabela 4.16.1.**). Wynik ten dowodzi, że badane polifenole są silniejszymi antyoksydantami, niż TR oraz, że wykazują dużą zdolność do oddawania elektronu podczas interakcji z wolnymi rodnikami. Spośród wszystkich badanych związków *trans*-3,4,4'-THS jest najbardziej podatny na transfer elektronu [187]. Mniejsze wartości BDE niż AIP dowodzą, że badane substancje działają jako silne antyoksydanty zgodnie z mechanizmem HAT, który jest najbardziej preferowany w analizowanych środowiskach. *Trans*-3,4,4'-THS oraz *trans*-3,4-DHS charakteryzują się najmniejszą wartością BDE [187]. Jest to konsekwencja obecności dwóch elektronodonorowych grup hydroksylowych w jednym pierścieniu oraz faktu, że silne oddziaływanie wodorowe między grupami 4O-H i 3O-H może prowadzić do osłabienia wiązań 3-O-H i 4-O-H. Duża zdolność do oddawania elektronu przez *trans*-4,4'-DHS jest, z kolei, wynikiem symetrycznego ułożenia grup hydroksylowych w położeniach *para*. Stosunkowo mała wartość AIP dla tego związku w badanych środowiskach w pełni potwierdza wniosek. Wyniki dowodzą, że aktywność antyoksydacyjna badanych związków silnie zależy od ilości grup hydroksylowych oraz ich ułożenia. Obliczone wartości AIP oraz BDE dla α,β -dihydro-3,4',5-THS wskazują, że aktywność antyoksydacyjna jest zależna od obecności wiązania winylowego. Brak wiązania winylowego w tym związku prowadzi do znaczącego zwiększenia wartości AIP i, tym samym, do osłabienia jego zdolności elektronodonorowych. Medium wodne wpływa w znaczący sposób na wartości AIP (**Tabela 4.16.1.**) [187] – obserwujemy w nim wyraźne zmniejszenie wartości tego parametru, w porównaniu z próżnią. Wynik wskazuje, że woda ułatwia jonizację badanych polifenoli, dlatego związki te mogą efektywnie zmiatać wolne rodniki zgodnie z mechanizmem ET. W medium wodnym BDE przyjmuje nieznacznie wyższe wartości niż w próżni. Stąd wnioskujemy, że: woda zmniejsza podatność grup hydroksylowych na rozpad homolityczny, mechanizm HAT może dominować w środowisku niepolarnym błon lipidowych.

Stereoizomery *cis* są mniej podatne na jonizację i transfer wodoru na rodniki niż *trans* [187]. Silnie zgięta geometria rodników fenoksyłowych izomerów *cis* utrudnia delokalizację

elektronu wzdłuż szkieletu stilbenowego, natomiast niepłaska geometria form neutralnych zwiększa trwałość wiązania O-H i powoduje nieefektywną delokalizację elektronów π w pierścieniach aromatycznych.



Rys. 4.16.1. Trójwymiarowy rozkład gęstości spinowej otrzymany za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) w próżni dla 4'-O- i 4-O-rodników tlenowych: a)TR, b) *trans*-4,4'-DHS, c) *trans*-3,4,5-THS, d) *trans*-3,4,4'-THS, e) *trans*-3,4-DHS, f) α,β -dihydro-3,4',5-THS oraz g) CR

Kontur orbitalu HOMO jest zdelokalizowany na całym szkielecie *trans*-stilbenowym badanych związków, przy czym, największą gęstość prawdopodobieństwa obserwujemy w po-

zycjach 4'-O, 4-O oraz wzdłuż wiązania winylowego [187]. Duży stopień delokalizacji orbitalu HOMO dowodzi, że związki te posiadają dużo aktywnych centrów reakcyjnych typu *redox*. W przypadku α,β -dihydro-3,4',5-THS obserwujemy, że orbital ten jest tylko zlokalizowany na pierścieniu **a**, ponieważ brak wiązania winylowego uniemożliwia pełną delokalizację orbitalu HOMO.

Największy przyczynek do całkowitej gęstości spinowej pochodzi od atomów tlenu 4'-O oraz 4-O [187]. Najmniejsze wartości gęstości spinowej na atomach O4' oraz O4 w *trans*-3,4,4'-THS dowodzą, że polifenol ten jest najefektywniejszym antyoksydantem spośród wszystkich analizowanych. W przypadku 4'-O-rodników *trans*-4,4'-DHS, *trans*-3,4,4'-THS oraz α,β -dihydro-3,4',5-THS gęstość spinowa głównie pochodzi od pierścienia **a**, natomiast w przypadku 4-O-rodników *trans*-3,4-DHS, *trans*-3,4,5-THS, *trans*-3,4,4'-THS pochodzi głównie od pierścienia **b**. W 4'-O-rodniku α,β -dihydro-3,4',5-THS obserwujemy małą gęstość spinową na atomie tlenu 4'-O z powodu braku wiązania winylowego. Ponadto, w *cis* 4'-O-rodnikach gęstość spinowa na atomach wiązania winylowego przyjmuje dużo większe wartości, niż w przypadku izomerów *trans* (**Rys. 4.16.1**). Gęstość spinowa na atomie O4' TR jest mniejsza, niż na tym samym atomie CR. Dowodzi to, że TR jest silniejszym antyoksydantem, niż CR oraz, że 4'-O-rodnik TR jest bardziej stabilny energetycznie, niż 4'-O-rodnik CR. W medium wodnym wartości tego parametru są mniejsze niż w próżni (**Tabela 4.16.2**), dlatego badane rodniki są bardziej stabilizowane przez medium wodne, a badane polifenole wykazują większą aktywność przeciwutleniającą niż TR [187]. Obliczone wartości gęstości spinowej w medium wodnym potwierdzają, że wszystkie stereoizomery *trans* badanych pochodnych TR są silniejszymi antyoksydantami niż on sam.

4.17. Zależność struktura – aktywność antyoksydacyjna oligomerów, glukozydów oraz siarczanów(VI) TR

Deskryptory antyoksydacyjne (BDE i AIP) równowagowych geometrii oligomerów TR (*trans*- δ -winiferyny, *cis*- ϵ -winiferyny, *trans*- δ -winiferyny-A, *trans*- δ -winiferyny-B, pallidolu, gnetiny H oraz α -winiferyny), dimeru 4,4'-DHS, glukozydów (izomery geometryczne piceidu oraz *trans*-astringina) oraz 3-O-glukuronianu (**Rys. 1.1.2. i 1.1.3.**) TR obliczono na poziomie B3LYP/6-311G(d,p) w próżni oraz medium wodnym korzystając z modelu C-PCM [188].

Wyniki obliczeń (**Tabela 4.17.1.**) pokazują, że wszystkie oligomery, glukozydy oraz 3-O-glukuronian charakteryzują się mniejszą wartością AIP niż TR [188] i, tym samym, mają one większe zdolności elektronodonorowe niż TR. α -Winiferyna oraz 3-O-glukuronian są

najbardziej podatne na transfer elektronu podczas reakcji z wolnymi rodnikami. Obecność w centralnej części cząsteczki α -winiferyny szkieletu cyklooktanowego oraz trzech fragmentów dihydrofuranowych jest głównym czynnikiem strukturalnym, który determinuje dużą aktywność antyoksydacyjną. Wyniki dowodzą, że *cis*-stereoizomery ϵ -winiferyny oraz piceidu są mniej podatne na transfer elektronu niż ich stereoizomery *trans* [188]. Silnie zgięty szkielet stilbenowy w izomerach *cis* oraz ich kationorodnikach powoduje wzrost wartości AIP i jednocześnie zmniejsza aktywność antyoksydacyjną. 4'- β -O-D-glukopiranozyd TR jest mniej podatny na oddawanie elektronu, niż *trans*-piceid. Dlatego zdolności elektronodonorowe są silnie uzależnione od lokalizacji podstawnika glukopiranozowego w szkielecie *trans*-stilbenowym. Pallidol, w porównaniu z innymi oligomerami charakteryzuje się małą podatnością na oddawanie elektronu. Najprawdopodobniej jest to spowodowane brakiem w tym oligomerze szkieletu *trans*-stilbenowego. AIP przyjmuje w medium wodnym wartości zdecydowanie mniejsze niż w próżni (**Tabela 4.17.1.**) [188]. Silne oddziaływanie polarnego medium z dodatnio naładowanymi kationorodnikami przyczynia się do tak dużych różnic w wartościach AIP. Wynik ten dowodzi, że mechanizm zmiatania wolnych rodników oparty na transferze elektronu z antyoksydanta na rodnik będzie bardziej preferowany w medium wodnym niż w niepolarnym. Obliczone wartości AIP w wodzie dowodzą, że α -winiferyna oraz 3-O-glukuronian są najbardziej podatne na jonizację.

Wiązanie 4O-H w szkielecie *trans*-stilbenowym stereoizomerów ϵ -winiferyny, dimeru *trans*-4,4'-DHS, gnetiny H oraz wiązanie 3O-H w stereoizomerach *trans*- δ -winiferyny jest najbardziej podatne na rozpad homolityczny (**Tabela 4.17.2.**) [188]. Dlatego grupa 4-OH głównie determinuje aktywność antyoksydacyjną. Wartości BDE dla *trans*- δ -winiferyny-A są zdecydowanie mniejsze, niż dla *trans*- δ -winiferyny-B. W rezultacie *trans*- δ -winiferyna-A ma większą zdolność do transferu wodoru, niż *trans*- δ -winiferyna-B. Analiza geometrii tych stereoizomerów sugeruje, że występowanie w nich pierścieni **c** i **d** w konfiguracji *trans* ma duży wpływ na zwiększenie trwałości wiązań O-H w *trans*- δ -winiferynie-B. Ponadto, w *trans*- ϵ -winiferynie oraz *trans*-piceidzie wiązanie 4'O-H jest słabsze niż w stereoizomerach *cis*. Stąd wnioskujemy, że stereoizomery *trans* posiadają większe zdolności do oddawania wodoru, niż stereoizomery *cis* i dzięki temu mechanizm HAT jest dla nich bardziej preferowany. W α -winiferynie wiązania 2'O-H oraz 2O-H są najsłabsze, gdyż dla nich BDE przyjmuje najmniejsze wartości. BDE dla pallidolu przyjmuje podobne wartości, co jest spowodowane symetryczną geometrią tego dimeru. Takie podobieństwo aktywności antyoksydacyjnej grup O-H sugeruje, że pallidol może być efektywnym zmiataczem wolnych rodników, w którym

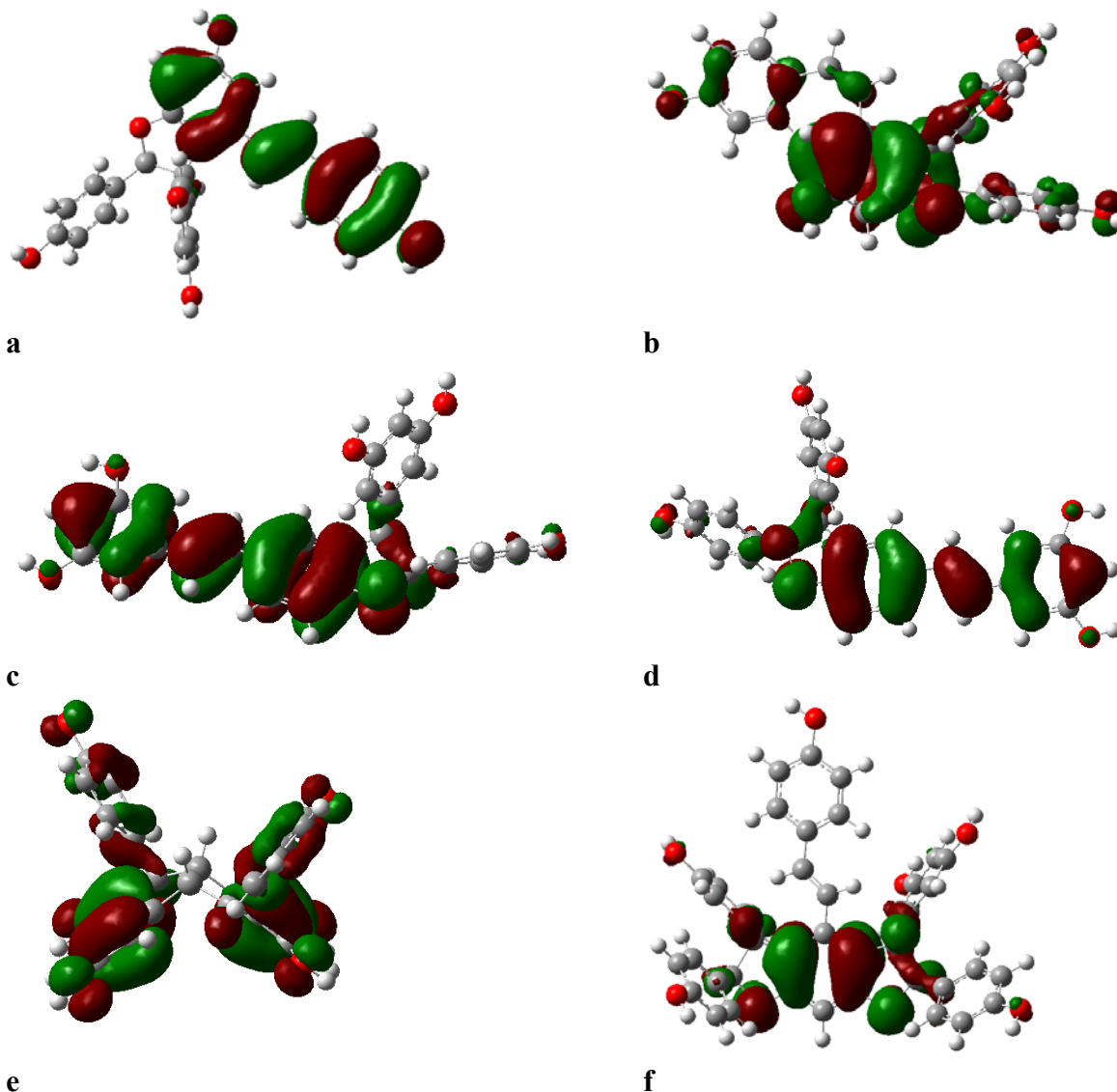
wszystkie te grupy będą uczestniczyły w reakcji z wolnymi rodnikami [188]. Symetryczna budowa α -winiferyny sprawia, że w tym związku również wszystkie wiązania O-H cechuje podobna stabilność. Należy jednakże podkreślić, że spośród wszystkich wiązań O-H w α -winiferynie, wiązania 2-O-H oraz 2'-O-H są najbardziej podatne na rozpad. Porównując obliczone wartości BDE oraz AIP dla badanych związków widzimy, że AIP przyjmuje dużo większe wartości niż BDE w próżni oraz w medium wodnym [188]. Oznacza to, że oligomery TR, glukozydy TR oraz 3-O-glukuronian TR zmiatają wolne rodniki zgodnie z mechanizmem HAT.

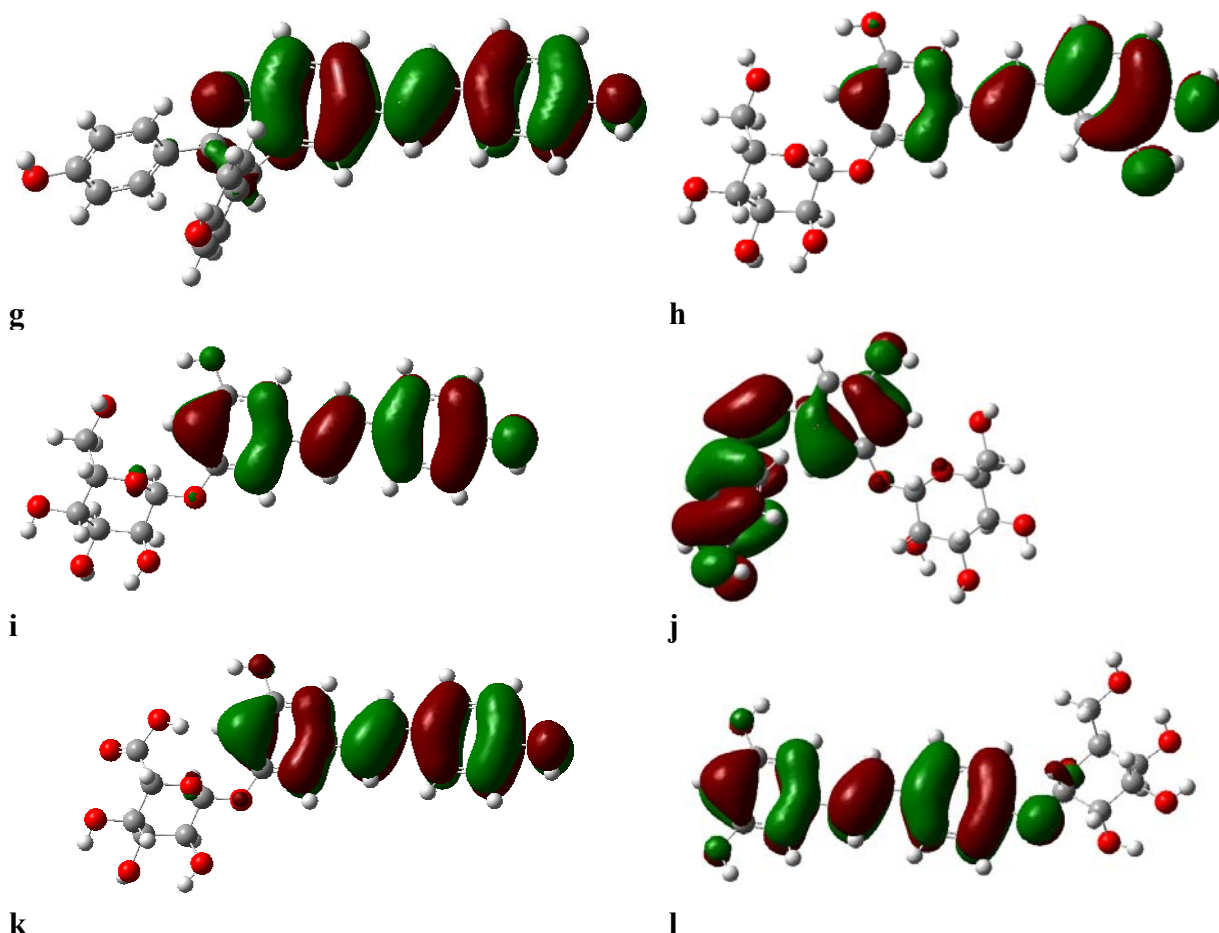
Wartości BDE (**Tabela 4.17.2.**) dla wiązania 4'-O-H w TR, *trans*-piceidzie, 3-O-glukuronianie są nieznacznie mniejsze niż dla wiązania 5-O-H [188]. W związku z tym wnioskujemy, że antyoksydanty te charakteryzują się podobną zdolnością do oddawania wodoru w reakcji z rodnikami oraz, że grupa 4'-OH jest szczególnie aktywna w reakcji z wolnym rodnikiem. Spośród wszystkich badanych substancji *trans*-astringina charakteryzuje się najmniejszą wartością BDE wiązania 4'-O-H. Prawdopodobnie obecność reszty glukopiranozowej prowadzi do zmniejszenia trwałości wiązania 4'-O-H [188]. Obliczenia przewidują również, że 3-O-glukuronian może być potencjalnym przeciwutleniaczem. Wynik ten dowodzi, że na poziomie komórkowym stres antyoksydacyjny może być zmniejszany zarówno przez TR, jak i glukuronian, który jest łatwo rozpuszczalny w wodzie. Obliczone wartości BDE wiązań 3-O-H oraz 5-O-H w 4'-O- β -D-glukopiranozydzie TR pokazują, że glukozyd ten ma mniejszą zdolność do transferu wodoru niż TR [188]. Podstawienie atomu wodoru w grupie 4'-OH resztą glukopiranozową prowadzi do zmniejszenia aktywności przeciwutleniającej. Wynik ten dowodzi, że zdolność glukozydów do oddawania wodoru jest skorelowana z lokalizacją reszty β -O-glukopiranozowej w szkieletcie *trans*-stilbenowym. Wynik ten potwierdza rezultat uzyskany przez Kim i wsp. [163] – glukozyd ten jest słabszym przeciwutleniaczem niż TR w procesie inhibicji peroksydacji lipidów.

Najmniejszy przyczynek do całkowitej wartości gęstości spinowej pochodzi od atomów tlenu występujących w szkieletcie *trans*- i *cis*-stilbenowym stereoizomerów δ -winiferyny, ϵ -winiferyny oraz gnetyny H. Stosunkowo małe wartości tego parametru potwierdzają dużą aktywność antyoksydacyjną tych substancji i trwałość energetyczną rodników fenoksylowych [188]. Rodnik 4-O dimeru 4,4'-DHS charakteryzuje się najmniejszą wartością tego parametru (**Tabela 4.17.3.**). Zatem, w dimerze tym wiązanie 4-O-H jest bardzo podatne na rozpad homolityczny. Ponadto, wkład do całkowitej gęstości spinowej od atomu 4'-O TR, *trans*-piceidu, *trans*-astringiny oraz 3-O-glukuronianu jest mniejszy niż od pozostałych atomów tlenu.

Większa wartość gęstości spinowej na 4'-O atomie tlenu w 4'-O-rodnikach *cis* izomerów ϵ -winiferyny oraz piceidu dowodzi, że 4'-O-rodniki w stereoizomerach *trans* są stabilniejsze energetycznie niż *cis*.

Analiza trójwymiarowego rozkładu konturu orbitalu HOMO w badanych oligomerach i glukozydach TR ujawniła, że jest on głównie zlokalizowany na atomach szkieletu *trans*-stilbenowego (**Rys. 4.17.1.**) [188] oraz wzdłuż wiązania winylowego, a także na atomach tlenu grup OH znajdujących się w tym szkielecie. Należy pokreślić, że w pallidolu kontur orbitalu HOMO jest zdelokalizowany wzdłuż całej cząsteczki z powodu symetrycznej budowy tego związku. W konsekwencji, w pallidolu wszystkie grupy OH charakteryzują się podobną aktywnością biologiczną, co znajduje swoje potwierdzenie w obliczonych wartościach BDE dla tego dimeru.





Rys. 4.17.1. Rozkład konturu orbitalu HOMO w: a) *trans*- ϵ -winiferynie, b) *cis*- ϵ -winiferynie, c) *trans*- δ -winiferynie-A, d) *trans*- δ -winiferynie-B, e) pallidolu, f) gnetinie H, g) dimerze *trans*-4,4'-DHS, h) *trans*-astranginie, i) *trans*-piceidzie, j) *cis*-piceidzie, k) 3-O-glukuronianie TR oraz l) 4'-O- β -D-glukopiranozydzie TR

Otrzymane wyniki przyczyniają się do teoretycznego wyjaśnienia „*paradoksu francuskiego*”. Do tej pory uważano, że lecznicze właściwości czerwonego wina są głównie zdeterminowane przez obecność w nim TR. Niestety, ilość zawartego w winie TR jest mała, co sugeruje, że polifenol ten nie jest główną substancją decydującą o aktywności biologicznej wina. Przeprowadzone obliczenia pokazały, że występujące w czerwonym winie oligomery oraz glukozydy są silniejszymi antyoksydantami niż TR. Biorąc pod uwagę fakt, że stężenia tych związków w winie są większe niż TR, należy przypuszczać, że duża antyoksydacyjna aktywność czerwonych win wynika z obecności w nich bioaktywnego kompleksu, składającego się z oligomerów i glukozydów TR. Kolejnym etapem badań będzie wykazanie aktywności antyoksydacyjnej dla antocyjanidów (palarginidyny oraz delfinidyny), które występują w stosunkowo dużych ilościach w czerwonych winach i są silnymi przeciwutleniaczami. Porównanie aktywności antyoksydacyjnej tych substancji, TR oraz oligomerów i glukozydów TR będzie

stanowiło kolejny krok w kierunku teoretycznego wyjaśnienia leczniczych i protekcyjnych właściwości wina.

Parametry antyoksydacyjne dla siarczanów(VI) TR (**Rys. 4.6.3.**) wyznaczono przy zastosowaniu B3LYP/6-311++G(3df,2p), ponieważ obecność atomu siarki sprawia, że użycie tej bazy funkcyjnej jest konieczne do prawidłowego opisu struktury elektronowej tych substancji. Obliczenia w medium wodnym wykonano, stosując model solwatacyjny C-PCM. Badane siarczany(VI) charakteryzują się znacznie większą wartością AIP, niż TR w badanych środowiskach (**Tabela 4.17.4.**). Stąd wnioskujemy, że siarczany(VI) są słabszymi donorami elektronu niż TR. Podobnie, jak we wcześniej analizowanych układach obserwujemy, że w medium wodnym parametr ten przyjmuje znacznie mniejsze wartości, niż w próżni. W związku z tym siarczany są bardziej efektywnymi zmiataczami wolnych rodników w medium polarnym niż w niepolarnym. Spośród wszystkich badanych związków najmniejszą wartością AIP charakteryzuje się 3-O-siarczan(VI). Wynik ten dowodzi, że wraz ze zmniejszeniem ilości reszt siarczanowych zwiększa się zdolność do oddawania elektronu, a tym samym podatność na jonizację.

Obliczone wartości BDE dla wiązań 4'O-H oraz 3O-H w siarczanach(VI) (**Tabela 4.17.4.**) są mniejsze niż w TR. Wynik ten dowodzi, że siarczany(VI) efektywniej będą zmiatały wolne rodniki, niż TR, w wyniku przeniesienia wodoru z obojętnej cząsteczki antyoksydanta na rodnik. Najprawdopodobniej obecność silnie elektronoakceptorowych grup siarczanowych sprzyja zmniejszaniu trwałości tych wiązań. Obliczone wartości BDE dla TR przy zastosowaniu metody B3LYP/6-311++G(3df,2p) pozostają w zgodności z wartościami otrzymanymi przez Leopoldini i wsp. [160]. Nieznaczne różnice mogą wynikać z zastosowania różnych modeli solwatacyjnych. W siarczanach(VI) wiązanie 4'O-H charakteryzuje się najmniejszą trwałością spośród wszystkich grup OH dołączonych bezpośrednio do pierścieni fenyłowych. Porównując otrzymane wartości BDE dla siarczanów i TR wnioskujemy, że wszystkie siarczany(VI) są silniejszymi antyoksydantami, niż TR. Duża polarność tych związków i, co za tym idzie, ich wysoka biodostępność będzie zapewniać efektywne zmiatanie wolnych rodników na poziomie komórkowym. TR w hepatocytach ulega biotransformacji do siarczanów(VI). Ten fakt oraz wyniki obliczeń wskazują, że siarczany(VI) wraz z TR w komórkach będą synergistycznie zmniejszały stres antyoksydacyjny.

4.18. Zależność struktura – aktywność antyoksydacyjna polifenoli z orzecha ziemnego (*Arachis hypogaea*)

W celu wykazania właściwości antyoksydacyjnych polifenoli występujących w orzechu ziemnym (*trans*-arachidinu-1, *trans*-arachidinu-2, *trans*-arachidinu-3 oraz *trans*-3'-izopentadienylo-3,5,4'-trihydroksystilbenu) (**Rys. 1.8.1.**) obliczono deskryptory antyoksydacyjne (AIP oraz BDE) na poziomie B3LYP/6-311G(d,p). Parametry geometryczne i antyoksydacyjne wyznaczono w próżni i w medium wodnym, korzystając z modelu C-PCM. Przeprowadzone obliczenia miały na celu znalezienie korelacji między aktywnością antyoksydacyjną, a obecnością w badanych związkach szkieletu izopentenyłowego oraz izopentadienyłowego. Obliczono wartości BDE dla wiązania 4'-O-H, gdyż ono, podobnie jak w TR grupa 4'-OH, jest najbardziej reaktywne. Obliczenia te pozwoliły porównać jego trwałość ze stabilnością wiązania 4'-O-H w cząsteczce TR.

Wszystkie badane związki charakteryzują się znacznie mniejszymi wartościami AIP, niż TR w próżni oraz w medium wodnym (**Tabela 4.18.1.**). Zatem polifenole te charakteryzują się większą aktywnością elektronodonorową, niż TR. Zmniejszenie wartości AIP w porównaniu z TR może być związane z obecnością szkieletu izopentenyłowego oraz izopentadienyłowego, który zapewnia większy stopień delokalizacji niesparowanego elektronu w kationorodnikach. Silna delokalizacja przyczynia się do zwiększenia trwałości energetycznej kationorodników i, w efekcie, prowadzi do zmniejszania wartości AIP. Ponadto, w medium wodnym wartości AIP są znacznie mniejsze, niż w próżni i, w konsekwencji, badane polifenole są bardziej podatne na transfer elektronu w wodzie niż w środowisku niepolarnym.

Wartości BDE wiązań 4'-O-H dla badanych polifenoli są mniejsze, niż dla TR (**Tabela 4.18.1.**). Dla *trans*-arachidinu-1 mała trwałość tego wiązania jest wynikiem silnego oddziaływania wodorowego między grupą 4'-OH a 3'-OH. Uzyskane wyniki dowodzą, że obecność szkieletu izopentenyłowego oraz izopentadienyłowego prowadzi do zmniejszenia trwałości wiązań 4'-O-H. Mała odległość między grupą 4'-OH oraz izopentadienyłową, sprzężony układ wiązań podwójnych w tym podstawniku oraz znaczna stabilizacja rezonansowa 4'-O-rodników, są głównymi czynnikami, zmniejszającymi wartość BDE. Wiązanie 4'-O-H w środowisku wodnym jest mniej podatne na rozerwanie homolityczne niż w próżni. Wynik ten wskazuje, że w mediach niepolarnych badane polifenole będą efektywniej zmiatały wolne rodniki zgodnie z mechanizmem HAT, niż w mediach polarnych. Podsumowując, należy stwierdzić, że polifenole występujące w orzechach ziemnych są silniejszymi zmiataczami

wolnych rodników niż TR. Otrzymane wyniki potwierdzają wnioski Chang i wsp. [177], dowodzące, że ekstrakt polifenoli wyizolowany z orzeszków ziemnych charakteryzuje się silną aktywnością antyoksydacyjną.

4.19. Zależność struktura – aktywność antyoksydacyjna metoksyłowych pochodnych TR i PC

Parametry antyoksydacyjne (AIP, BDE) wyznaczono na poziomie B3LYP/6-311G(d,p) dla równowagowych geometrii następujących metoksyłowych pochodnych TR: pterostilbenu, hydropterostilbenu, rapontygeniny oraz izorapontygeniny (**Rys. 4.5.1.**). W związku z tym, że rapontygenina, hydropterostilben oraz izorapontygenina są metoksyłowymi pochodnymi PC, wyznaczono także te parametry dla tego polifenolu. Celem wykonanych obliczeń było zbadanie wpływu podstawnika metoksyłowego i jego lokalizacji w szkielecie *trans*-stilbenowym na aktywność przeciwutleniającą.

Obliczone wartości AIP dla badanych substancji są mniejsze, niż dla TR w analizowanych mediach (**Tabela 4.19.1.**). W związku z tym obecność grup metoksyłowych zwiększa zdolności elektronodonorowe badanych substancji. Rapontygenina, izorapontygenina oraz hydropterostilben charakteryzują się mniejszą wartością AIP niż pterostilben. Wynik ten dowodzi, że wraz ze wzrostem ilości grup hydroksyłowych wzrasta podatność antyoksydanta na jonizację. W medium wodnym obserwujemy zdecydowane zmniejszenie wartości AIP w porównaniu z próżnią. Dlatego w wodzie, badane substancje będą szczególnie silnie podatne na jonizację. Rapontygenina, izorapontygenina oraz hydropterostilben charakteryzują się mniejszą wartością parametru AIP niż PC. Wynik ten dowodzi, że podstawienie atomów wodoru grup OH piceatannolu grupą metylową zwiększa zdolności elektronodonorowe pochodnych metoksyłowych.

W metoksyłowych pochodnych wiązanie 4'-O-H jest trwalsze, niż w TR oraz charakteryzuje się najmniejszą wartością BDE i jest, tym samym, najbardziej podatne na rozpad homolityczny (**Tabela 4.19.1.**). W rapontygeninie wiązanie to jest mniej trwałe, niż w pterostilbenie, gdyż oddziaływanie grupy metoksyłowej z grupą 4'-OH prowadzi do osłabienia tego wiązania. W przypadku PC wiązanie 3'-O-H jest najmniej trwałe spośród wszystkich pozostałych wiązań O-H, co zostało również potwierdzone w omawianej wcześniej analizie strukturalnej. Silne wiązanie wodorowe między grupami 3'-OH i 4'-OH powoduje zmniejszenie trwałości tego wiązania. To dowodzi, że aktywność antyoksydacyjna PC jest głównie zdeterminowana dużą reaktywnością wodoru z grupy 3'-OH. Uzyskane rezultaty pokazują, że po-

chodne metoksylowe są mniej efektywnymi donorami wodoru niż TR. Obecność elektrondonorowych i słabo aktywujących pierścieni fenylo-*orto* i *meta* przyczynia się do wzmocnienia wiązań O-H. Ponadto, bazując na fakcie, że wartości BDE są znacznie mniejsze, niż AIP, można wnioskować, że pochodne te w układach biologicznych będą reagowały z rodnikami zgodnie z mechanizmem HAT. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami eksperymentalnymi Stivali i wsp. [81], którzy na podstawie empirycznych parametrów antyoksydacyjnych stwierdzili, że pochodne metoksylo-TR są słabszymi przeciwutleniaczami niż TR.

5. WNIOSKI

Na podstawie wyników przeprowadzonych obliczeń kwantowo-mechanicznych możemy sformułować następujące wnioski:

1. Najbardziej stabilne energetycznie struktury TR oraz jego *trans*-pochodne (hydroksylo-*trans*-stilbenowe, metoksylo-*trans*-stilbenowe, glukozidy oraz 3-O-glukuronian), zoptymalizowane przy pomocy metody DFT, charakteryzują się w badanych mediach obecnością płaskiego szkieletu *trans*-stilbenowego. Struktura TR otrzymana za pomocą metody MP2 i HF na poziomie baz gaussowskich jest silnie zgięta, natomiast wraz ze wzrostem funkcji bazowych w bazach Dunninga, dąży do konformacji płaskiej. Równowagowa geometria TR wyznaczona na PES, wygenerowanym na poziomie MP2(full)/aug-cc-pVTZ jest płaska. Wynik ten dowodzi, że TR posiada płaską geometrię szkieletu *trans*-stilbenowego na poziomie metod DFT i MP2. Badania NMR w roztworze wodnym potwierdzają płaską konformację TR [218]. Stereoizomery *cis* badanych substancji posiadają szkielet stilbenowy zgięty, niezależnie od zastosowanej metody i bazy funkcyjnej z powodu istnienia zawady sterycznej. Uzyskane wyniki pozwoliły w sposób jednoznaczny rozwiązać problem geometrii TR.
2. Wszystkie zoptymalizowane rodniki fenoksylo-*trans*-stilbenowe, kationorodniki oraz formy anionowe posiadają płaski szkielet *trans*-stilbenowy w badanych mediach, co zapewnia korzystną energetycznie delokalizację niesparowanego elektronu i wolnej pary elektronowej. Formy rodnikowe oraz anionowe są silnie stabilizowane przez rezonans.
3. TR jest labilny torsyjnie, a proces izomeryzacji TR w CR jest endoenergetyczny i preferowany energetycznie. Z kolei, obliczone wartości zmiany entalpii swobodnej Gibbsa wskazują, że proces ten nie zachodzi samorzutnie. Podczas rotacji pierścieni fenylo-

wych wokół wiązań pojedynczych C4-C7 oraz C8-C9 słabnie π - π koniugacja między pierścieniami fenyłowymi.

4. TR jest silniejszym przeciwutleniaczem, niż CR. Mechanizm HAT jest bardziej preferowany w medium etanolowym, niż w wodnym, natomiast w wodzie TR jest bardziej podatny na jonizację niż w etanolu. W związku z tym, że wartości BDE są znacznie mniejsze niż AIP, TR zmiata wolne rodniki zgodnie z mechanizmem HAT w rozważanych mediach. W medium wodnym polifenol ten jest bardziej podatny na jonizację niż w etanolowym. Płaska geometria szkieletu *trans*-stilbenowego TR zwiększa podatność wiązania 4'-O-H na rozpad homolityczny w badanych mediach. Wyniki obliczeń dowodzą, że TR w płaskiej konformacji jest silniejszym przeciwutleniaczem niż w konformacji zgiętej.
5. Stereoizomery *trans* badanych substancji wykazują większą aktywność antyoksydacyjną niż *cis*. Wiązanie winylowe, ilość i lokalizacja polarnych grup hydroksylowych oraz płaski szkielet *trans*-stilbenowy są głównymi parametrami geometrycznymi, które zapewniają badanym związkom efektywne zmiatanie wolnych rodników w układach biologicznych.
6. Pochodne hydroksylowe, oligomery, glukozydy, siarczany(VI) oraz 3-O-glukuronian TR są silniejszymi antyoksydantami w badanych mediach, niż TR. Otrzymane wyniki teoretycznie wyjaśniają tzw. „paradoksu francuskiego”. Do tej pory uważano, że lecznicze właściwości czerwonego wina są głównie zdeterminowane przez obecność w nim TR. Ilość zawartego w winie TR jest mała, co sugeruje, że polifenol ten nie jest główną substancją decydującą o aktywności biologicznej wina. Ponieważ występujące w czerwonym winie oligomery oraz glukozydy (*trans*-astringina i *trans*-piceid) są silniejszymi antyoksydantami, niż TR, a ich stężenia w winie są większe, niż TR, należy przypuszczać, że duża antyoksydacyjna aktywność czerwonych win wynika z obecności w nich bioaktywnego kompleksu składającego się z oligomerów i glukozydów TR. Uzyskane wyniki sugerują, że główne metabolity TR, takie, jak siarczany(VI) oraz 3-O-glukuronian mogą synergistycznie zmniejszać stres antyoksydacyjny w komórkach. Ponadto fakt, że siarczany(VI) oraz 3-O-glukuronian są znacznie mniej toksyczne niż inne polifenole, a jednocześnie bardziej od nich aktywne antyoksydacyjne oraz lepiej biodostępne sprawia, że związki te mogą wykazywać silniejsze działanie farmakologiczne niż czysty TR.

7. TR tworzy energetycznie stabilne kompleksy z jonem Cu^{2+} , 5'-monofosforanem(V) tymidyny, dinukleotydem oraz fosfolipidem (*cis,cis*-2,3-dilinolenolanem-1-fosforan(V) glicerolu). W kompleksach tych szkielet *trans*-stilbenowy jest płaski, a hydratacja jonu Cu^{2+} powoduje znaczne obniżenie trwałości tych kompleksów. W obecności TR następuje rozerwanie wiązania fosfodiesterowego, któremu towarzyszy przeniesienie protonu z grupy 4'-OH TR na atom 3'O deoksyrybozy. Wyniki te pozwalają wytłumaczyć silną aktywność antynowotworową i antylipemiczną TR i jego kompleksów z jonami Cu^{2+} .
8. Mechanizm oparty na insercji rodnika hydroksylowego do wiązania winylowego jest najbardziej preferowany termodynamicznie. Dlatego TR jest antyoksydantem, który może zmiatać wolne rodniki zgodnie z kilkoma niezależnymi mechanizmami antyoksydacyjnymi. Otrzymany wynik tłumaczy dużą aktywność antyoksydacyjną TR w komórkach żywych, którą możemy porównać z dysmutazą ponadtlenkową.
9. TR i hydroksymocznik są efektywnymi inhibitorami aktywności reduktazy rybonukleotydowej. Uzyskany wynik wyjaśnia aktywność antyproliferacyjną TR oraz sugeruje, że inhibicja tego enzymu może być kompetycyjna. Wyniki pokazują, że TR może być potencjalnym chemoterapeutykem, który efektywnie hamuje proces powstawania deoksyrybonukleotydów w komórkach nowotworowych oraz w wirusach zawierających DNA
10. TR tworzy słabo związane kompleksy z molekułą wody. Wynik ten pokazuje, że TR jest substancją hydrofobową, która posiada dużą zdolność do transferu przez niepolarne błony biologiczne.

Tabela 1.1.1. Źródła występowania TR oraz innych stilbenoidów w przyrodzie i w produktach żywnościowych

Stilbenoid	Produkt żywnościowy	Literatura
Resweratrol	Winogrona	Jeandet i wsp. 1995, Wang i wsp. 2002, Vian i wsp. 2005, Liew i wsp. 2005, Gonzalez-Barrio i wsp. 2005, Yilmaz i wsp. 2004, Roldan i wsp. 2003
	Wino	Cantos i wsp. 2003, Wang i wsp. 2002, Vian i wsp. 2005, Liew i wsp. 2005, Shu i wsp. 2005, Gambuti i wsp. 2004
	Szyszki chmielu	Tedesco i wsp. 2005, Jerkovic i wsp. 2005, Callemien i wsp. 2005
	Borówka czarna	Ehala i wsp. 2005, Lyons i wsp. 2003, Rimando i wsp. 2004
	Borówka wysoka, <i>Vaccinium angustifolium</i> , <i>Vaccinium virgatum</i> , <i>Vaccinium elliotii</i>	Lyons i wsp. 2003., Rimando i wsp. 2004
	Borówka <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Ehala i wsp. 2005
	Żurawina	Ehala i wsp. 2005, Wang i wsp. 2002, Rimando i wsp. 2004
	Borówka <i>Vaccinium stamineum</i>	Rimando i wsp. 2004
	Borówka <i>Vaccinium vitis-idaea</i> var. <i>vitis-idaea</i>	Rimando i wsp. 2004
	Borówka <i>Vaccinium arboreum</i>	Rimando i wsp. 2004
	Borówka brusznica (czerwona)	Rimando i wsp. 2004
	Truskawka	Ehala i wsp. 2005
	Czerwona porzeczka	Ehala i wsp. 2005
	Rabarbar	Kageura i wsp. 2001
	Pistacja właściwa	Tokusoglu i wsp. 2005
	Morwa	Deshpande i wsp. 1975
	Orzech ziemny	Liu i wsp. 2003, Tokusoglu i wsp. 2005, Wang i wsp. 2005, Frank i wsp. 2003, Chen i wsp. 2002, Chung i wsp. 2000, Sanders i wsp. 2000, Sobolev i wsp. 1999, Schoppner i wsp. 1984
	Masło orzechowe	Sobolev i wsp. 1999, Ibern-Gomez i wsp. 2000
Piceatannol	Winogrona	Cantos i wsp. 2003
	Wino	Cantos i wsp. 2003
	Trzcina cukrowa	Brinker i wsp. 1991
	Rabarbar	Kageura i wsp. 2001

	Borówka <i>Vaccinium stamineum</i>	Rimando i wsp. 2004
	Borówka wysoka	Rimando i wsp. 2004
Pinosylwina	Orzeszki piniowe	Skinnider i wsp. 1986, Kodan i wsp. 2002, Chiron i wsp. 2000, Wollenweber i wsp. 2003, Lee i wsp. 2005, Schanz i wsp. 1992
Rapontygenina	Rabarbar	Matsuda i wsp. 2001, Matsuda i wsp. 2000, Ko i wsp. 1999, Suresh i wsp. 2004
Pterostilben	Winogrona	Adrian i wsp. 2000, Pezet i wsp. 1998, Douillet-Breuil i wsp. 1999
	Borówka <i>Vaccinium virgatum</i>	Rimando i wsp. 2004
	Borówka <i>Vaccinium stamineum</i>	Rimando i wsp. 2004
	Ekologiczne i uprawiane tradycyjnie borówki dostępne w sprzedaży	Remsberg i wsp. nieopublikowany
Astringina	Winogrona	Waffo-Teguo i wsp. 2001, Landrault i wsp. 2002
	Wino	Carando i wsp. 1999, Ribeiro de Lima i wsp. 1999, Vitrac i wsp. 2005
Piceid	Winogrona	Bavaresco i wsp. 2003
	Wino	Vian i wsp. 2005, Ribeiro de Lima i wsp. 1999, Vitrac i wsp. 2005, Moreno-Labanda i wsp. 2004
	Szyszki chmielu	Jerkovic i wsp. 2005, Callemien i wsp. 2005
Winiferyna	Winogrona	Huang i wsp. 2005, Zhang i wsp. 2004, Pezet i wsp. 2003
	Wino	Vitrac i wsp. 2005

Tabela 1.1.2. Farmakologiczne i farmakokinetyczne badania TR

Model zwierzęcy	Droga podania	Podsumowanie	Literatura
Szczur	Dożylna (IV)	Znacząca biodostępność dla serca, powinowactwo do tkanki nerek	Bertelli i wsp. 1996
Szczur/mysz	Dootrzewnowa (IP)	Całkowita ilość resweratrolu w moczu i surowicy krwi w formie sprzężonej	Yu i wsp. 2002
Szczur	Pokarmowa	¹⁴ C-TR preferuje żołądek, wątrobę, nerki, tkanki jelita; jest eliminowany z żółcią i moczem	Vitrac i wsp. 2004
Szczur	Dożylna (IV) i pokarmowa	Wzmoczona recyrkulacja wewnątrz wątroby, jelito odgrywa ważną rolę w glukuronidacji resweratrolu, przechodzi intensywną glukuronidację – efekt pierwszego przejścia, biodostępność w przybliżeniu 38%, dominuje wydalenie z żółcią	Marier i wsp. 2002
Mysz	Pokarmowa	Redukcja masy i objętości nowotworu, redukcja przerzutów nowotworowych do płuc	Kimura i wsp. 2000
Mysz	Dożołądkowa (IG)	Zwiększenie proliferacji limfocytów i produkcji IL-2	Feng i wsp. 2002
Mysz	Miejscowa	Hamowanie obrzęku skóry, wywołanego promieniami UVB	Afaq i wsp. 2003
Myszokoczek	Dootrzewnowa (IP)	Przekracza barierę krew-mózg, chroni przed niedokrwieniem mózgu	Wang i wsp. 2002
Królik	Dożołądkowa (IG)	Ograniczenie funkcji śródbłónka	Zou i wsp. 2003
Człowiek	Pokarmowa	Absorpcja resweratrolu w aktywnych farmakologicznie stężeniach z soku winogronowego zmniejsza ryzyko miażdżycy tętnic	Pace-Asciak i wsp. 1996
Człowiek	Pokarmowa	Resweratrol dominuje w moczu i w surowicy krwi w postaci sprzężonej	Yu i wsp. 2002
Człowiek	Pokarmowa	Metabolity są nieaktywne w badaniach antywirusowych nad HIV w odniesieniu do samego resweratrolu	Wang i wsp. 2004
Ludzkie mikrosomy	Pokarmowa	Nieodwracalny inhibitor CYP 3A4, odwracalny inhibitor CYP 2E1	Piver i wsp. 2001
Człowiek	Pokarmowa	Aktywność antyoksydacyjna, resweratrol z powodu niewielkiej dostępności biologicznej raczej nie daje znacząco korzystnych efektów zdrowotnych	Vitaglione i wsp. 2005

Tabela 1.1.3. Zawartość stilbenoidów w winach z Francji i Portugalii [mg/L]

Wino	<i>trans</i> -astringina		<i>trans</i> -piceid		<i>cis</i> -piceid		TR		CR		Stilbeny, razem (av)
	min–maks	av	min–maks	av	min–maks	av	min–maks	av	min–maks	av	
jednogatunkowe białe wina, Portugalia (50)	nw–15,6	5,4	nw–5,8	2,6	nw–4,0	1,3	nw–2,1	0,6	nw–1,7	0,4	10,2
mieszane białe wina, Portugalia (9)	2,4–11,3	5,5	1,2–4,7	2,9	nw–2,8	1,2	nw–0,5	0,5	nw–0,9	0,2	10,4
wzmocnione wina, Portugalia (15)	nw–13,4	8,0	1,6–7,0	4,5	nw–3,9	1,6	0,3–2,1	0,8	nw–0,6	0,1	15,1
jednogatunkowe czerwone wina, Portugalia (34)	nw–35,9	10,4	nw–50,8	11,8	nw–17,9	5,0	nw–5,7	1,0	nw–9,5	2,6	30,6
mieszane czerwone wina, Portugalia (5)	nw–24,8	10,3	nw–17,1	8,0	nw–8,1	3,3	nw–3,9	1,5	0,7–4,0	2,1	25,1
czerwone wina, Francja (7)	2,5–26,1	13,1	3,1–32,8	13,0	nw–5,3	1,9	0,6–6,8	3,0	1,1–5,3	2,6	33,7
białe wina, razem (74)	nw–15,6	5,9	nw–7,0	3,0	nw–4,0	1,4	nw–2,1	0,6	nw–1,7	0,3	11,2
czerwone wina, razem (46)	nw–35,9	10,8	nw–50,8	11,6	nw–17,9	4,3	nw–6,8	1,3	nw–9,5	2,5	30,5
wina, razem (120)	nw–35,9	7,8	nw–50,8	6,3	nw–17,9	2,5	nw–6,8	0,9	nw–9,5	1,1	18,6

Tabela 1.5.1. Wpływ resweratrolu na nowotwory

Typ komórek	Działanie	Literatura
Białaczka (limfocyty B)	Inhibicja proliferacji, indukcja apoptozy	Billard i wsp. 2002
Białaczka (HL60)	Indukcja apoptozy, inhibicja wzrostu komórek	Dorrie i wsp. 2001, Kang i wsp. 2003
Białaczka (limfocyty T u osób dorosłych)	Indukcja apoptozy	Hayashibara i wsp. 2002
Białaczka (THP-1)	Indukcja apoptozy, inhibicja wzrostu komórek	Tsan i wsp. 2000, Pemdurthi i wsp. 2002
Piersi (MDA-MB-231)	Indukcja apoptozy, inhibicja proliferacji i wzrostu komórek	Mgbonyebi i wsp. 1998, Scarlatti i wsp. 2003
Piersi (MCF-7)	Indukcja apoptozy, inhibicja wzrostu	Mgbonyebi i wsp. 1998, Serrero i wsp. 2001, Lu i wsp. 1999
Okrężnica (HCT-116)	Indukcja apoptozy	Mahyar-Roemer i wsp. 2001, Wolter i wsp. 2002
Okrężnica (Caco-2)	Indukcja apoptozy	Wolter i wsp. 2002
Okrężnica (F344 szczurzy model)	Inhibicja powstawania raka okrężnicy	Tessitore i wsp. 2000
Prostata (LnCap)	Inhibicja wzrostu	Hsieh i wsp. 2000, Stewart i wsp. 2004
Prostata (DU-145)	Indukcja apoptozy, inhibicja wzrostu	Lin i wsp. 2002, Kampa i wsp. 2000
Prostata (PC-3)	Indukcja apoptozy, inhibicja wzrostu	Stewart i wsp. 2004
Wątroba (HepG2)	Inhibicja wzrostu, zmniejszenie naciekania komórek HepG2 indukowanego przez Czynn timer Wzrostu Hepatocytów	De Ledinghen i wsp. 2001
Wątroba (Fao szczurzy model)	Zahamowanie cyklu komórkowego, inhibicja proliferacji	Delmas i wsp. 2000
Czerniak (A431)	Indukcja apoptozy	Ahmad i wsp. 2001, Adhami i wsp. 2001
Czerniak (A375)	Indukcja apoptozy	Niles i wsp. 2003
Czerniak (SK-Mel-28)	Indukcja apoptozy	Niles i wsp. 2003, Larrosa i wsp. 2003
Jajniki (PA-1)	Indukcja apoptozy	Yang i wsp. 2003
Endometrium (śluzówka macicy)	Inhibicja proliferacji	Bhat i wsp. 2001

Tabela 4.1.1. Równowagowe wartości długości wiązań [Å], kątów [deg] i całkowitej energii TR wyznaczone za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) oraz B3LYP/aug-cc-pVDZ

Parametr	Baza funkcyjna			
	6-311G(d,p)	aug-cc-pVDZ	6-311G(d,p)	6-311G(d,p)
	próżnia	próżnia	woda	etanol
O(4')-C(1)	1,365	1,371	1,360	1,361
O(3)-C(11)	1,367	1,373	1,363	1,363
O(5)-C(13)	1,367	1,373	1,363	1,364
O(4')-H(4')	0,963	0,965	0,983	0,982
O(5)-H(5)	0,962	0,965	0,982	0,981
O(3)-H(3)	0,962	0,965	0,982	0,981
C(7)-C(8)	1,345	1,351	1,347	1,347
C(4)-C(7)	1,463	1,466	1,464	1,465
C(8)-C(9)	1,466	1,469	1,468	1,468
C(2)-C(3)	1,390	1,389	1,385	1,386
C(1)-C(2)	1,395	1,403	1,402	1,401
C(10)-C(11)	1,389	1,396	1,397	1,396
C(12)-C(13)	1,399	1,399	1,396	1,396
C(5)-C(4)-C(7)-C(8)	0,0	0,3	0,1	0,0
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	0,0	0,1	0,1	0,0
O(1)-C(1)-C(2)	117,5	117,3	117,5	117,5
O(1)-C(1)-C(6)	123,0	122,9	123,1	123,1
O(2)-C(11)-C(10)	117,3	117,1	117,2	117,1
O(2)-C(11)-C(12)	121,8	122,1	122,2	122,3
O(3)-C(13)-C(12)	122,2	121,6	121,8	121,9
O(3)-C(13)-C(14)	117,2	117,1	117,2	117,1
Energia [hartree]	-766,571	-766,584	-766,613	-766,611

Tabela 4.1.2. Wartości całkowitej energii [hartree] TR, CR, 4'-O-rodnika, kationorodnika oraz form anionowych otrzymane za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) (a) oraz B3LYP/6-311+G(d,p) (b) w próżni, medium wodnym i etanolowym

Indywidualum chemiczne	Próżnia	Medium wodne	Medium etanolowe
CR(a)	-766,563	-766,603	-766,601
CR(b)	-766,580	-766,623	-766,622
4'-O-rodnik CR(a)	-765,924	-765,963	-765,961
Kationorodnik CR(a)	-766,308	-766,411	-766,404
4'-O-monoanion CR(b)	-766,032	-766,143	-766,139
3-O-monoanion CR(b)	-766,025	-766,141	-766,136
3,4'-O-dianion CR(b)	-765,389	-765,659	-765,649
3,5,4'-O-trianion CR(b)	-764,618	-766,152	-765,146
3,5-O-dianion CR(b)	-765,334	-765,647	-765,633
TR(a)	-766,571	-766,613	-766,611
TR(b)	-766,589	-766,633	-766,631
4'-O-rodnik TR(a)	-765,935	-765,975	-765,973
Kationorodnik TR(a)	-766,321	-766,424	-766,611
4'-O-monoanion TR(b)	-766,045	-766,154	-766,149
3-O-monoanion TR(b)	-766,035	-766,151	-766,146
3,4'-O-dianion TR(b)	-765,408	-765,669	-765,661
3,5,4'-O-trianion TR(b)	-764,641	-765,174	-765,158
3,5-O-dianion TR(b)	-765,347	-765,658	-765,647

Tabela 4.1.3. Równowagowe długości wiązań [Å], kątów [deg] i wartości całkowitej energii [hartree] TR i CR wyznaczone w próżni za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p)

Parametry geometryczne i energia	TR	CR
	6-311++G (3df,2p)	6-311++G (3df,2p)
O(4')-C(1)	1,364	1,366
O(3)-C(11)	1,365	1,367
O(5)-C(13)	1,365	1,367
O(4')-H(4')	0,962	0,960
O(3)-H(3)	0,961	0,961
O(5)-H(5)	0,961	0,961
C(7)-C(8)	1,342	1,343
C(4)-C(7)	1,460	1,469
C(8)-C(9)	1,463	1,473
C(2)-C(3)	1,388	1,383
C(1)-C(2)	1,391	1,393
C(10)-C(11)	1,389	1,387
C(12)-C(13)	1,387	1,392
C(5)-C(4)-C(7)-C(8)	0,0	31,5
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	0,0	39,4
C(2)-C(1)-O(4')-H(4')	0,0	0,0
C(10)-C(11)-O(3)-H(3)	0,0	0,0
C(14)-C(13)-O(5)-H(5)	0,0	0,0
Energia	-766,645	-766,636

Tabela 4.1.4. Równowagowe długości wiązań [Å], kątów [deg] i wartości całkowitej energii [hartree] TR wyznaczone w próżni za pomocą MP(full)2/6-311G(d,p) oraz MP2(full)/aug-ccpVDZ

Wiązania i kąty	MP2(full)/6-311G(d,p)	MP2(full)/aug-cc-pVDZ
O(4')-C(1)	1,366	1,380
O(3')-C(6)	—	—
O(3)-C(11)	1,367	1,382
O(5)-C(13)	1,367	1,382
O(4')-H(4')	0,962	0,968
O(3')-H(3')	—	—
O(3)-H(3)	0,962	0,968
O(5)-H(5)	0,962	0,968
C(5)-C(4)-C(7)-C(8)	25,5	15,7
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	28,2	19,6
C(2)-C(1)-O(4')-H(4')	0,3	0,3
C(1)-C(6)-O(3')-H(3')	—	—
C(10)-C(11)-O(3)-H(3)	1,8	0,7
C(14)-C(13)-O(5)-H(5)	0,0	0,3
Energia	-764,396	-764,297

Tabela 4.1.5. Równowagowe wartości kątów torsyjnych [deg] TR wyznaczone za pomocą metod DFT, MP2 oraz HF w próżni

Baza funkcyjna	DFT		HF		MP2(full)	
	α	θ	α	θ	α	θ
6-31G(d,p)	0,4	0,7	21,4	26,3	23,5	26,7
6-31+G(d,p)	1,1	1,5	22,8	28,0	24,3	27,1
6-311G(d,p)	0,1	0,2	18,9	25,2	25,5	31,0
6-311+G(d,p)	0,1	0,4	19,2	28,2	27,8	33,1
6-311++G(3df,2p)	0,0	0,1	16,2	20,2	16,5	20,2
aug-cc-pVDZ	0,0	0,0	5,8	11,9	4,9	9,9
aug-cc-pVTZ	0,0	0,0	1,4	4,2	—	—
aug-cc-pVQZ	0,0	0,0	0,3	2,1	—	—
cc-pVDZ	0,3	0,8	—	—	14,5	15,3
cc-pVTZ	0,0	0,0	—	—	10,2	11,3
cc-pVQZ	0,0	0,0	—	—	7,3	8,5

Tabela 4.2.1. Równowagowe długości wiązań [Å], kątów [deg] i wartości całkowitej energii [hartree] PC wyznaczone za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) oraz B3LYP/6-311++G(3df,2p)

Wiązania i kąty	B3LYP/6-311G(d,p)	B3LYP/6-311++G(3df,2p)
O(4')-C(1)	1,36	1,38
O(3')-C(6)	1,35	1,36
O(3)-C(11)	1,37	1,36
O(5)-C(13)	1,37	1,38
O(4')-H(4')	0,96	0,96
O(3')-H(3')	0,96	0,97
O(3)-H(3)	0,96	0,96
O(5)-H(5)	0,96	0,96
C(1)-C(2)	1,70	1,41
C(2)-C(3)	1,39	1,40
C(4)-C(7)	1,86	1,47
C(7)-C(8)	1,35	1,36
C(8)-C(9)	1,49	1,49
C(10)-C(11)	1,39	1,40
C(12)-C(13)	1,39	1,40
C(5)-C(4)-C(7)-C(8)	0,0	0,0
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	0,0	0,0
C(2)-C(1)-O(4')-H(4')	0,3	0,3
C(1)-C(6)-O(3')-H(3')	0,4	0,2
C(10)-C(11)-O(3)-H(3)	2,8	0,7
C(14)-C(13)-O(5)-H(5)	0,0	0,3
O(4')-C(1)-C(2)	124,1	124,0
O(4')-C(1)-C(6)	117,9	116,9
O(3)-C(11)-C(10)	121,5	123,5
O(3)-C(11)-C(12)	117,7	117,2
O(5)-C(13)-C(12)	116,8	116,7
O(5)-C(13)-C(14)	121,7	122,9
Energia	-841,815	-841,833

Tabela 4.2.2. Wartości całkowitej energii [hartree] PC, jego kationorodnika, form rodnikowych oraz anionowych wyznaczone w próżni za pomocą B3LYP/6-311+G(d,p)

Indywidualne chemiczne	Energia
PC	-841,837
4'-O-rodnik	-841,213
Kationorodnik	-841,583
4'-O-monoanion	-841,306
3-O-monoanion	-841,283
3,4'-O-dianion	-840,630
3,5,4'-O-trianion	-841,905
3,5-O-dianion	-841,596
3'-O-monoanion	-841,275
3'-O-rodnik	-841,191
3-O-rodnik	-841,193
3',4',3,5-tetraanion	-839,039
3',4'-dianion	-840,610
3',3-dianion	-840,645
3,5,3'-trianion	-839,991
4',3',3-trianion	-841,884

Tabela 4.2.3. Równowagowe długości wiązań [Å], kątów [deg] i wartości całkowitej energii [hartree] PC wyznaczone na poziomie MP2(full)/6-311G(d,p)

Wiązania i kąty	Wartość
O(4')-C(1)	1,38
O(3')-C(6)	1,36
O(3)-C(11)	1,37
O(5)-C(13)	1,37
O(4')-H(4')	0,96
O(3')-H(3')	0,96
O(3)-H(3)	0,96
O(5)-H(5)	0,96
C(1)-C(2)	1,39
C(2)-C(3)	1,39
C(4)-C(7)	1,46
C(7)-C(8)	1,35
C(8)-C(9)	1,47
C(10)-C(11)	1,39
C(12)-C(13)	1,39
C(5)-C(4)-C(7)-C(8)	22,4
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	25,7
C(2)-C(1)-O(4')-H(4')	17,8
C(1)-C(6)-O(3')-H(3')	3,3
C(10)-C(11)-O(3)-H(3)	176,0
C(14)-C(13)-O(5)-H(5)	179,5
O(4')-C(1)-C(2)	124,8
O(4')-C(1)-C(6)	114,9
O(3)-C(11)-C(10)	117,2
O(3)-C(11)-C(12)	122,1
O(5)-C(13)-C(12)	122,4
O(5)-C(13)-C(14)	117,3
Energia	-839,543

Tabela 4.3.1. Obliczone wartości bariery rotacyjnej [kcal/mol] za pomocą metody MP2 dla TR

Medium	MP2/ aug-cc-pVDZ	MP2/ aug-cc-pVTZ	MP2/ aug-cc-pVQZ	MP4/ 6-311G(d,p)	MP2/ 6-311G(d,p)
Próżnia	12,54	11,98	10,56	9,05	8,75
Woda	14,83	13,66	12,23	10,23	9,98
Etanol	13,38	12,89	11,45	9,15	8,32

Tabela 4.3.2. Obliczone wartości barier rotacyjnych [kcal/mol] za pomocą metody MP2 dla przejścia TR w formę posiadającą dwa pierścienie obrócone o 90°

Medium	MP2/ aug-cc-pVDZ	MP2/ aug-cc-pVTZ	MP2/ aug-cc-pVQZ	MP4/ 6-311G(d,p)	MP2/ 6-311G(d,p)
Próżnia	11,76	10,23	9,83	8,11	7,86
Woda	13,64	12,73	11,72	10,08	9,67
Etanol	12,43	11,36	10,09	9,17	8,75

Tabela 4.3.3. Obliczone wartości barier rotacyjnych [kcal/mol] za pomocą metody MP2 dla przejścia TR w formę posiadającą jeden pierścień obrócony o 90°

Medium	MP2/ aug-cc-pVDZ	MP2/ aug-cc-pVTZ	MP2/ aug-cc-pVQZ	MP4/ 6-311G(d,p)	MP2/ 6-311G(d,p)
Próżnia	10,43	9,21	8,36	7,13	6,74
Woda	11,33	10,21	9,98	8,23	7,99
Etanol	10,99	9,37	8,78	8,15	7,71

Tabela 4.4.1. Równowagowe długości wiązań [Å], kątów [deg] i wartości całkowitej energii [hartree] otrzymane w próżni za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) dla: TR, CR, *trans*-4,4'-DHS, *trans*-3,4,5-THS, *trans*-3,4,4'-THS, *trans*-3,4-DHS, 4'-O-rodniku *trans*-TR, 4'-O-rodniku *trans*-4,4'-DHS, 4-O-rodniku 3,4-*trans*-DHS, 4-O-rodniku *trans*-3,4,5-THS, 4'-O-rodniku *trans*-3,4,4'-THS, 4-O-rodniku 3,4,4'-THS, 4'-O-rodniku α,β -dihydro-3,4',5-THS oraz 4'-O-rodniku CR [187]

Indywidualne chemiczne	Wiązanie				Kąt torsyjny		Energia
	C=C	O ₄ -H ₄	O ₃ -H ₃	O ₄ '-H ₄ '	α	θ	
TR	1,34	–	0,96	0,96	0,0	0,0	-766,571
CR	1,34	–	0,96	0,96	27,4	39,2	-766,563
<i>Trans</i> -4',4-DHS	1,35	0,96	–	0,96	0,0	0,0	-69,328
<i>Trans</i> -3,4,5-THS	1,34	0,965	0,962	–	6,9	6,5	-766,573
<i>Trans</i> -3,4,4'-THS	1,34	0,96	0,96	0,96	0,3	0,5	-766,572
<i>Trans</i> -3,4-DHS	1,34	0,96	0,96	–	0,0	0,0	-691,328
α,β -dihydro-3,4',5-THS	–	–	0,96	0,96	–	–	-767,793
4'-O-rodnik TR	1,36	–	0,96	–	0,0	0,0	-765,935
4'-O-rodnik 4',4-DHS	1,36	0,96	–	–	0,0	0,0	-690,694
4-O-rodnik 3,4,5-THS	1,36	–	0,96	–	0,0	0,0	-765,948
4-O-rodnik 3,4-DHS	1,36	–	0,96	–	0,0	0,0	-690,707
4'-O-rodnik α,β -dihydro-3,4',5-THS	–	–	0,96	–	–	–	-767,151
4'-O-rodnik 3,4,4'-THS	1,36	0,96	0,98	–	0,0	0,0	-765,938
4-O-rodnik 3,4,4'-THS	1,36	–	0,98	0,9	0,0	0,0	-765,952
4'-O-rodnik CR	1,36	–	0,96	–	15,7	36,5	-765,924

Tabela 4.4.2. Równowagowe długości wiązań [Å], kątów [deg] i wartości całkowitej energii [hartree] otrzymane w medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) dla: TR, CR, *trans*-4,4'-DHS, *trans*-3,4,5-THS, *trans*-3,4,4'-THS, *trans*-3,4-DHS, 4'-O-rodniku *trans*-TR, 4'-O-rodniku *trans*-4,4'-DHS, 4-O-rodniku 3,4-*trans*-DHS, 4-O-rodniku *trans*-3,4,5-THS, 4'-O-rodniku *trans*-3,4,4'-THS, 4-O-rodniku 3,4,4'-THS, 4'-O-rodniku α,β -dihydro-3,4',5-THS oraz 4'-O-rodniku CR [187]

Indywidualne chemiczne	Wiązanie				Kąt torsyjny		Energia
	C=C	O ₄ -H ₄	O ₃ -H ₃	O ₄ -H ₄	α	θ	
TR	1,35	–	0,98	0,98	0,1	0,0	-766,613
CR	1,35	–	0,98	0,98	26,5	38,6	-766,604
<i>Trans</i> - 4',4'-DHS	1,35	0,98	–	0,98	0,0	0,0	-691,361
<i>Trans</i> -3,4,5-THS	1,35	0,98	0,97	–	4,6	4,0	-766,605
<i>Trans</i> -3,4,4'-THS	1,35	0,983	0,976	0,982	0,3	0,5	-766,609
<i>Trans</i> -3,4-DHS	1,35	0,983	0,976	–	0,0	0,0	-691,356
α,β -dihydro-3,4',5-THS	–	–	0,98	0,98	–	–	-767,833
4'-O-rodnik TR	1,37	–	0,98	–	0,1	0,1	-765,975
4'-O-rodnik 4',4'-DHS	1,37	0,985	–	–	0,0	0,0	-690,725
4-O-rodnik 3,4,5-THS	1,37	–	0,99	–	0,0	0,0	-765,981
4-O-rodnik 3,4-DHS	1,36	–	0,98	–	0,0	0,0	-690,728
4'-O-rodnik α,β -dihydro-3,4',5-THS	–	–	0,98	–	–	–	-767,188
4'-O-rodnik 3,4,4'-THS	1,37	0,985	0,978	–	0,0	0,0	-765,974
4-O-rodnik 3,4,4'-THS	1,37	–	0,98	0,98	0,0	0,0	-765,983
4'-O-rodnik CR	1,37	–	0,98	–	19,4	36,5	-765,963

Tabela 4.4.3. Obliczone w próżni i w medium wodnym na poziomie B3LYP/6-311G(d,p) całkowite energie [hartree] *cis*-stereoizomerów i ich rodników oraz entalpie izomeryzacji *cis-trans* [kcal/mol] [187]

Substancja i rodnik	Energia (próżnia)	Entalpia izomeryzacji (próżnia)	Energia (medium wodne)	Entalpia izomeryzacji (medium wodne)
CR	-766,563	5,189	-766,604	5,743
<i>Cis</i> -4,4'-DHS	-691,321	4,644	-691,349	7,314
<i>Cis</i> -3,4,5-THS	-766,559	8,637	-766,594	6,642
<i>Cis</i> -3,4,4'-THS	-766,565	4,470	-766,599	5,900
<i>Cis</i> -3,4-DHS	-691,322	4,609	-691,347	5,966
4'-O-rodnik CR	-765,924	6,531	–	–
4'-O-rodnik <i>cis</i> -4,4'-DHS	-690,684	6,311	–	–
4-O-rodnik <i>cis</i> -3,4,5-THS	-765,939	5,738	–	–
4'-O-rodnik <i>cis</i> -3,4,4'-THS	-765,927	6,504	–	–
4-O-rodnik <i>cis</i> -3,4-DHS	-690,697	6,350	–	–
4-O-rodnik <i>cis</i> -3,4,4'-THS	-765,924	6,531	–	–

Tabela 4.5.1. Równowagowe wartości długości wiązań O-H [Å] w polifenolach otrzymane próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311G(d,p)

Substancja	4'-O-H (próżnia)	3'-O-H (próżnia)	3-O-H (próżnia)	5-O-H (próżnia)	4'-O-H (woda)	3'-O-H (woda)	3-O-H (woda)	5-O-H (woda)
TR	0,96	–	0,96	0,96	0,983	–	0,98	0,98
Pterostilben	0,96	–	–	–	0,98	–	–	–
Pinosylwina	–	–	0,96	0,96	–	–	0,98	0,98
Rapontygenina	0,96	–	0,958	0,959	0,98	–	0,98	0,98
Izorapontygenina	–	0,96	0,96	0,96	–	0,98	0,98	0,98
Hydropterostilben	0,96	0,96	–	–	0,98	0,98	–	–
Deoksyrapontygenina	–	–	0,96	0,96	–	–	0,98	0,98
Pinostilben	0,960	–	0,957	–	0,98	–	–	0,98

Tabela 4.5.2. Równowagowe wartości kątów torsyjnych α [deg] oraz θ [deg] polifenoli otrzymane za pomocą metod DFT, MP2(full) oraz HF w bazach 6-311G(d,p) oraz 6-311++G(3df,2p)

Substancja	B3LYP/ 6-311G (d,p)	HF/ 6-311G (d,p)	MP2/ 6-311G (d,p)	B3LYP/ 6-311++G (3df,2p)	B3LYP/ 6-311G (d,p)	HF/ 6-311G (d,p)	MP2/ 6-311G (d,p)	B3LYP/ 6-311++G (3df,2p)
	α	α	α	α	θ	θ	θ	θ
TR	0,1	18,9	25,5	0,0	0,0	25,2	28,1	0,0
Pterostilben	1,2	19,9	26,3	0,0	1,7	19,5	25,1	0,0
Pinosylwina	0,0	20,8	26,8	0,0	0,0	20,3	25,7	0,0
Rapontygenina	0,0	19,4	25,9	0,0	0,0	11,4	20,6	0,0
Izorapontygenina	0,0	18,9	22,6	0,0	0,0	13,9	24,9	0,0
Hydropterostilben	0,1	20,2	26,7	0,0	0,2	19,8	25,6	0,0
Deoksyrapontygenina	0,6	18,3	24,3	0,1	0,1	19,7	26,8	0,0
Pinostilben	0,4	19,8	22,4	0,0	0,2	13,6	25,7	0,0

Tabela 4.6.1. Równowagowe wartości długości wiązań O-H [Å] oligomerów i glukozydów w próżni otrzymane za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) [188]

Substancja	4-O-H	4'-O-H	2-O-H	2'-O-H	3-O-H	3'-O-H	1-OH	5-O-H
TR	–	0,963	–	–	0,962	–	–	0,962
<i>Trans</i> -4,4'-DHS	0,963	0,963	–	–	–	–	–	–
Dimer <i>trans</i> -4,4'-DHS	0,963	–	0,963	–	–	–	0,963	–
<i>Trans</i> - ϵ -winiferyna	0,963	–	0,962	–	–	0,962	0,963	–
<i>Cis</i> - ϵ -winiferyna	0,963	–	0,962	–	–	0,962	0,963	–
<i>Trans</i> - δ -winiferyna-A	0,963	–	0,962	–	0,962	–	–	0,962
<i>Trans</i> - δ -winiferyna-B	0,963	–	0,962	–	0,963	–	–	0,963
Gnetina H	0,963	–	–	–	0,962	–	0,963	–
Pallidol	0,962	0,962	–	0,962	–	0,962	–	–
<i>Trans</i> -piceid	–	0,963	–	–	–	–	–	0,964
<i>Cis</i> -piceid	–	0,964	–	–	–	–	–	0,963
<i>Trans</i> -astringina	–	0,962	–	–	–	0,966	–	0,963
3-O-glukuronian TR	–	0,963	–	–	–	–	–	0,963
<i>Trans</i> -resweratrol-4'-O- β -D-glukopiranozyd	–	–	–	–	0,962	–	–	0,962
Suffruticosol B	0,962	0,962	0,963	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962

Tabela 4.6.2. Równowagowe wartości kątów torsyjnych α [deg] oraz θ [deg] oligomerów, glukozydów i 3-O-glukuronianu TR otrzymane w próżni za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) [188]

Substancja	α	θ
TR	0,0	0,0
<i>Trans</i> -4,4'-DHS	0,0	0,0
Dimer <i>trans</i> -4,4'-DHS	5,7	5,9
<i>Trans</i> - ϵ -winiferyna	5,2	14,0
<i>Cis</i> - ϵ -winiferyna	26,9	44,8
<i>Trans</i> - δ -winiferyna-A	1,6	2,4
<i>Trans</i> - δ -winiferyna-B	0,2	1,5
Gnetina H	0,1	14,1
Pallidol	–	–
<i>Trans</i> -piceid	0,0	1,9
<i>Cis</i> -piceid	31,2	41,8
<i>Trans</i> -astringina	1,3	1,5
3-O-glukuronian TR	2,7	0,7
<i>Trans</i> -resweratrol-4'-O- β -D-glukopiranozyd	1,6	2,7
Suffruticosol B	–	–

Tabela 4.6.3. Wartości całkowitej energii [hartree] oligomerów, glukozydów oraz ich kationorodników otrzymane w próżni za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) [188]

Substancja	Molekuła	Kationorodnik
TR	-766,571	-766,321
<i>Trans</i> -4,4'-DHS	-691,328	-691,087
Dimer <i>trans</i> -4,4'-DHS	-1381,451	-1381,218
<i>Trans</i> - ϵ -winiferyna	-1531,937	-1531,694
<i>Cis</i> - ϵ -winiferyna	-1531,929	-1531,684
<i>Trans</i> - δ -winiferyna-A	-1531,937	-1531,699
<i>Trans</i> - δ -winiferyna-B	-1531,941	-1531,705
Gnetina H	-2297,305	-2297,071
Pallidol	-1531,958	-1531,712
<i>Trans</i> -piceid	-1377,479	-1377,239
<i>Cis</i> -piceid	-1377,468	-1377,226
<i>Trans</i> -astringina	-1452,721	-1452,483
3-O-glukuronian TR	-1451,532	-1451,304
<i>Trans</i> -resweratrol-4'-O- β -D-glukopiranozyd	-1377,479	-1377,233
Suffruticosol B	-2285,354	-2285,413

Tabela 4.6.4. Równowagowe wartości długości wiązań O-H [Å] w siarczanach(VI) TR otrzymane w próżni za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p)

Substancja	3-O-H	5-OH	4'-O-H
4.6.3.a	0,962	0,963	–
4.6.3.b	0,962	–	0,963
4.6.3.c	–	–	0,962
4.6.3.d	–	0,963	–
4.6.3.e	–	–	–

Tabela 4.6.5. Obliczone w próżni za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p) równowagowe wartości trwałych momentów dipolowych [D] dla siarczanów(VI) TR, ich kationorodników oraz TR

Substancja	Obojętna cząsteczka	Kationorodnik
4.6.3.a	5,132	12,320
4.6.3.b	4,219	12,425
4.6.3.c	10,046	14,152
4.6.3.d	3,519	12,001
4.6.3.e	5,916	12,650
TR	3,258	6,233

Tabela 4.7.1. Równowagowe wartości długości wiązań O-H [Å], kątów torsyjnych [deg] oraz energii [hartree] polifenoli wyizolowanych z orzecha ziemnego otrzymane w próżni za pomocą B3LYP/6-311G(d,p)

Substancja	Energia	θ	α	4'-O-H	3'-O-H	3-OH	5-O-H
<i>Trans</i> -arachidin-1	-1037,212	0,1	0,1	0,965	0,964	0,962	0,962
<i>Trans</i> -arachidin-2	-961,961	0,4	4,0	0,964	–	0,962	0,962
<i>Trans</i> -arachidin-3	-961,969	0,0	0,1	0,965	–	0,963	0,962
<i>Trans</i> -3'-izopentadienyl-3,5,4'-trihydrosystilben	-960,743	0,2	0,8	0,965	–	0,962	0,962

Tabela 4.8.1. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p) wartości energii stabilizacji ΔE_{stab} [kcal/mol], $\Delta E_{\text{stab}} + \text{ZPVE}$ [kcal/mol] oraz $\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ [kcal/mol] dla kompleksów TR–Cu(II) oraz CR–Cu(II)

Kompleks	ΔE_{stab} (próżnia)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{ZPVE}$ (próżnia)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ (próżnia)	ΔE_{stab} (woda)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{ZPVE}$ (woda)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ (woda)
4.8.1.a	103,12	97,03	102,87	120,65	114,75	118,56
4.8.1.b	105,10	98,15	104,65	124,63	118,64	122,69
4.8.1.c	101,23	94,23	100,89	118,09	109,43	116,89
4.8.1.d	102,56	95,24	101,97	119,53	112,07	117,79

Tabela 4.8.2. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/LANL2DZ całkowite wartości energii dla kompleksów TR–Cu(II) oraz CR–Cu(II)

Kompleks	Energia (medium wodne)	Energia (próżnia)
4.8.1.a	-961,869	-961,824
4.8.1.b	-961,892	-961,836
4.8.1.c	-961,832	-961,811
4.8.1.d	-961,879	-961,822

Tabela 4.9.1. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p) wartości energii stabilizacji ΔE_{stab} [kcal/mol], $\Delta E_{\text{stab}} + \text{ZPVE}$ [kcal/mol] oraz $\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ [kcal/mol] dla kompleksów TR–Cu(II)(H₂O)₄ oraz CR–Cu(II)(H₂O)₄

Kompleks	ΔE_{stab} (woda)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{ZPVE}$ (woda)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ (woda)	ΔE_{stab} (próżnia)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{ZPVE}$ (próżnia)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ (próżnia)
4.9.1a	45,36	34,75	38,52	28,44	18,95	22,06
4.9.1.b	46,76	35,64	39,02	30,53	21,43	23,14
4.9.1.c	43,53	31,95	36,32	26,85	17,06	20,75
4.9.1.d	44,21	33,53	37,23	27,09	17,77	21,40

Tabela 4.11.1. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p) wartości energii stabilizacji ΔE_{stab} [kcal/mol], $\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ [kcal/mol] dla kompleksów TR-dinukleotyd

Kompleks	ΔE_{stab} (woda)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ (woda)	ΔE_{stab} (próżnia)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ (próżnia)
4.11.1.a	136,32	135,02	93,23	92,12
4.11.1.b	139,43	138,40	96,41	95,03
4.11.1.c	138,54	137,81	95,53	94,42
4.11.1.d	139,20	138,23	96,23	95,43
4.11.1.e	131,76	130,01	90,74	89,74
4.11.1.f	132,79	130,93	92,43	91,78
4.11.1.g	133,03	131,87	93,15	91,98
4.11.1.h	133,59	131,79	93,15	91,89
4.11.1.i	142,85	140,04	100,67	98,23
4.11.1.j	141,35	139,73	98,45	98,53
4.11.1.k	139,56	138,30	97,98	96,04

Tabela 4.11.2. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą MP2(full)/6-311++G(3df,2p) wartości energii stabilizacji ΔE_{stab} [kcal/mol], $\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ [kcal/mol] dla kompleksów TR-dinukleotyd

Kompleks	ΔE_{stab} (próż- nia)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ (próżnia)	ΔE_{stab} (woda)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ (woda)
4.11.1.a	99,48	98,21	142,54	141,23
4.11.1.b	100,34	98,78	143,75	142,54
4.11.1.c	101,45	100,03	144,09	143,64
4.11.1.d	102,49	101,34	145,89	144,01
4.11.1.e	97,56	96,60	138,86	137,12
4.11.1.f	98,02	97,54	139,87	138,42
4.11.1.g	99,56	98,04	140,76	139,10
4.11.1.h	99,86	98,54	140,99	139,76
4.11.1.i	110,30	108,95	147,96	146,54
4.11.1.j	107,89	106,21	145,53	143,45
4.11.1.k	105,56	104,31	144,01	142,87

Tabela 4.12.1. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p) wartości energii stabilizacji ΔE_{stab} [kcal/mol], $\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ [kcal/mol] dla kompleksów TR–Cu(II)–O3–5'-monofosforan(V) tymidyny, TR–Cu(II)–O4'-5'-monofosforan(V) tymidyny, TR–Cu(II)–O3–(H₂O)₄–5'-monofosforan(V) tymidyny oraz TR–Cu(II)–O4'–(H₂O)₄–5'-monofosforan(V) tymidyny

Kompleks	ΔE_{stab} (woda)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BS-SE}$ (woda)	ΔE_{stab} (próżnia)	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BS-SE}$ (próżnia)
4.12.1.a	132,97	130,76	115,53	114,75
4.12.1.b	128,64	126,18	111,53	110,54
4.12.1.c	137,32	134,83	120,43	119,12
4.12.1.d	134,76	132,76	118,14	117,93
4.12.1.e	127,32	124,97	110,76	109,97
4.12.1.f	131,45	128,62	114,38	113,54
4.12.3.a	61,62	54,27	40,21	33,07
4.12.3.b	55,52	48,44	36,87	30,42
4.12.3.c	69,70	61,11	46,56	39,80
4.12.3.d	67,33	60,33	43,76	36,92
4.12.3.e	50,56	43,42	34,79	26,92
4.12.3.f	58,01	50,96	39,76	31,74

Tabela 4.13.1. Obliczone w próżni za pomocą metod DFT i MP2 wartości energii stabilizacji [kcal/mol] dla kompleksów TR–H₂O z uwzględnieniem BSSE i bez tej poprawki

Metoda	ΔE_{stab} dla 4.13.2.a	ΔE_{stab} dla 4.13.2.b	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ dla 4.13.2.a	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ dla 4.13.2.b
B3LYP/6-311++G(3df,2p)	7,76	6,09	6,43	4,54
B3LYP/6-311+G(2d,2p)	6,77	5,58	5,34	5,06
B3LYP/aug-cc-pVDZ	8,10	7,72	7,04	6,25
B3LYP/aug-cc-pVTZ	9,28	8,12	8,43	7,75
B3LYP/aug-cc-pVQZ	10,11	8,65	9,33	7,05
MP2(full)/6-311+G(2d,2p)	9,87	7,06	7,89	6,23
MP2(full)/6-311++G(3df,2p)	9,37	8,03	8,66	7,12
MP2(full)/aug-cc-pVDZ	10,68	9,46	9,86	8,63
MP2(full)/aug-cc-pVTZ	11,03	10,94	10,57	9,64
MP4(sdtq)/6-31+G(d,p)	9,01	8,89	8,87	7,43

Tabela 4.13.2. Obliczone w medium wodnym za pomocą metod DFT i MP2 wartości energii stabilizacji [kcal/mol] dla kompleksów TR– H₂O z uwzględnieniem BSSE i bez tej poprawki

Metoda	ΔE_{stab} dla 4.13.2.a	ΔE_{stab} dla 4.13.2.b	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ dla 4.13.2.a	$\Delta E_{\text{stab}} + \text{BSSE}$ dla 4.13.2.b
B3LYP/6-311++G(3df,2p)	10,73	9,64	9,75	8,54
B3LYP/6-311+G(2d,2p)	9,03	8,62	8,32	7,53
B3LYP/aug-cc-pVDZ	11,76	10,64	10,04	9,32
B3LYP/aug-cc-pVTZ	12,98	11,09	11,73	10,21
B3LYP/aug-cc-pVQZ	14,87	12,97	12,96	11,32
MP2(full)/6-31+G(2d,2p)	12,87	11,32	11,09	10,43
MP2(full)/6-311++G(3df,2p)	13,74	12,83	12,32	11,05
MP2(full)/aug-cc-pVDZ	14,83	13,23	13,32	12,24
MP2(full)/aug-cc-pVTZ	15,32	14,15	14,85	13,76
MP4(sdtq)/6-31+G(d,p)	13,03	12,95	12,97	12,01

Tabela 4.14.1. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p) wartości zmiany entalpii swobodnej Gibbsa [kcal/mol] dla reakcji rodnikowej inhibicji reduktazy rybonukleotydowej spowodowanej przez hydroksymocznik, TR i jego rodniki fenoksyłowe

Reakcja	Próżnia	Medium wodne
4.14.3.a	-3,175	-5,764
4.14.3.b	-0,432	-4,321
4.14.3.c	-4,301	-6,008
4.14.3.d	-0,260	-6,768
4.14.3.e	5,609	2,321
4.14.3.f	3,372	1,012
4.14.3.g	-3,432	-5,897
4.14.3.h	0,585	-3,145
4.14.3.i	-12,248	-15,679
4.14.3.j	-12,834	-15,987
4.14.3.k	-10,235	-13,453
4.14.3.l	4,723	1,479
4.14.3.m	-5,231	-8,210
4.14.3.n	-1,273	-4,412
4.14.3.o	-6,375	-9,678

Tabela 4.15.1. Obliczone za pomocą B3LYP/6-311+G(d,p) wartości zmiany entalpii swobodnej Gibbsa [kcal/mol] dla reakcji TR z wodą, anionem wodorotlenkowym oraz dla reakcji 4'-O-monoanionu, 3,4'-O-dianionu and 3,5-O-dianionu TR z cząsteczką wody oraz anionem OH w próżni, medium wodnym oraz etanolowym [189]

Reakcja	Próżnia	Medium wodne	Medium etanolowe
4.15.2.a	-87,108	-153,136	-150,752
4.15.2.b	169,059	48,188	50,828
4.15.2.c	174,581	48,153	52,574
4.15.2.d	395,684	99,881	108,788
4.15.2.e	433,803	108,924	116,883
4.15.2.f	707,200	158,978	175,012
4.15.3.d	226,611	51,693	57,959
4.15.3.e	311,509	59,094	66,224
4.15.3.f	437,272	50,054	58,129
4.15.3.g	-38,151	-52,344	-50,628
4.15.3.h	8,617	-53,983	-50,459
4.15.3.i	46,749	-44,943	-42,364

Tabela 4.15.2. Obliczone w próżni, medium wodnym oraz etanolowym za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) wartości AIP [kcal/mol], BDE [kcal/mol] oraz PDE [kcal/mol] dla TR [189]

TR i wiązania O-H	Próżnia			Medium wodne			Medium etanolowe		
	AIP	PDE	BDE	AIP	PDE	BDE	AIP	PDE	BDE
TR	154,054	–	–	115,843	–	–	118,987	–	–
4'-O-H	–	320,678	76,012	–	288,876	77,728	–	290,760	76,768
3-O-H	–	326,321	–	–	275,327	–	–	276,870	–

Tabela 4.15.3. Obliczone w próżni, medium wodnym oraz etanolowym za pomocą B3LYP/6-311+G(d,p) wartości AIP [kcal/mol], BDE [kcal/mol] oraz PDE [kcal/mol] dla TR [189]

TR i wiązania O-H	Próżnia			Medium wodne			Medium etanolowe		
	AIP	PDE	BDE	AIP	PDE	BDE	AIP	PDE	BDE
TR	157,061	–	–	118,940	–	–	119,814	–	–
4'-O-H	–	322,582	76,683	–	279,061	80,121	–	284,194	78,371
3-O-H	–	328,977	–	–	283,841	–	–	285,331	–

Tabela 4.15.4. Obliczone w próżni, medium wodnym oraz etanolowym za pomocą B3LYP/6-311+G(d,p) wartości PDE [kcal/mol] dla reakcji dysocjacji jonowej 4'-O-monoanionu (Reakcja 4.15.3.a), 3,4'-O-dianionu (Reakcja 4.15.3.b) oraz 3,5-O-dianionu TR (Reakcja 4.15.3.b) [189]

Reakcja	Próżnia	Medium wodne	Medium etanolowe
4.15.3.a	392,358	298,429	300,402
4.15.3.b	473,838	304,304	314,555
4.15.3.c	437,272	294,531	300,318

Tabela 4.15.5. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311+G(d,p) wartości zmiany entalpii swobodnej Gibbsa [kcal/mol] dla mechanizmów reakcji TR z rodnikiem hydroksylowym

Mechanizm	Próżnia	Medium wodne
HAT	-35,16	-38,67
Protonowy	-10,23	-34,32
ET	-32,75	-53,22
Insercja do wiązania winylowego	-103,59	-109,47
Z przegrupowaniem	-42,84	-50,56

Tabela 4.15.6. Obliczone za pomocą B3LYP/6-311++G(d,p) BDE [kcal/mol] dla wyselekcjonowanych konformacji TR

α [°]	θ [°]	BDE(próżnia)	BDE(medium wodne)
0,0	0,0	76,0	77,73
5,0	10,0	78,82	80,03
10,0	15,0	78,93	80,33
15,0	20,0	79,58	81,21
20,0	25,0	79,89	81,72
25,0	30,0	81,64	82,86
30,0	35,0	81,87	82,95
0,0	5,0	77,87	79,25
0,0	10,0	78,21	79,96
0,0	15,0	79,06	81,11
10,0	20,0	79,64	81,46
5,0	0,0	77,36	79,10
10,0	0,0	78,65	80,03

Tabela 4.16.1. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) wartości AIP [kcal/mol] and BDE [kcal/mol] dla wiązań 4'-O-H i 4-O-H w TR, CR, 4'-OH, *trans*-4,4'-DHS, *trans*-3,4,5-THS, *trans*-3,4,4'-THS, *trans*-3,4,4'-THS, *trans*-3,4-DHS oraz α,β -dihydro-3,4',5-THS [187]

Substancja	BDE (próżnia)	AIP (próżnia)	BDE (woda)	AIP (woda)
TR	78,683	157,061	80,728	118,940
<i>Trans</i> -4,4'-DHS	77,663	152,212	79,103	113,380
<i>Trans</i> -3,4,5-THS	71,816	151,342	73,914	116,339
<i>Trans</i> -3,4,4'-THS (4-OH)	68,986	150,227	70,075	112,398
<i>Trans</i> -3,4,4'-THS (4'-OH)	77,845	150,227	79,977	112,398
<i>Trans</i> -3,4-DHS	69,734	156,691	71,338	117,414
α,β -dihydro-3,4',5-THS	82,401	168,183	85,545	129,106
CR	80,026	159,349	82,731	120,837

Tabela 4.16.2. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą uB3LYP/6-311G(d,p) gęstości spinowe na O4' i O4 atomach w 4'-O and 4-O-rodnikach hydroksylowych pochodnych TR [187]

Rodnik fenoksyłowy	Gęstość spinowa (woda)	Gęstość spinowa (próżnia)
4'-O-rodnik TR	0,315	0,352
4'-O-rodnik <i>trans</i> -4,4'-DHS	0,314	0,342
4-O-rodnik <i>trans</i> -3,4,5-THS	0,312	0,340
4-O-rodnik <i>trans</i> -3,4,4'-THS	0,303	0,329
4'-O-rodnik <i>trans</i> -3,4,4'-THS	0,311	0,338
4-O-rodnik <i>trans</i> -3,4-DHS	0,309	0,334
4'-O-rodnik α,β -dihydro-3,4',5-THS	0,443	0,472
4'-O-rodnik CR	0,334	0,375

Tabela 4.17.1. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) wartości AIP [kcal/mol] dla oligomerów i glukozydów TR [188]

Substancja	AIP (próżnia)	AIP (woda)
TR	157,061	118,940
<i>Trans</i> -4,4'-DHS	152,212	113,380
Dimer <i>trans</i>-4,4'-DHS	146,140	116,160
<i>Trans</i> -ε-winiferyna	152,545	117,897
<i>Cis</i> -ε-winiferyna	154,185	119,839
<i>Trans</i> -δ-winiferyna-A	149,181	116,189
<i>Trans</i> -δ-winiferyna-B	148,242	118,778
Gnetina H	146,967	116,569
Pallidol	154,465	118,887
<i>Trans</i> -piceid	150,835	117,524
<i>Cis</i> -piceid	152,204	119,125
<i>Trans</i> -astringina	149,461	117,003
3-O-glukuronian TR	143,024	115,210
<i>Trans</i> -resweratrol-4'-O-β-D-glukopiranozyd	154,877	119,231
Suffruticosol B	141,238	108,235

Tabela 4.17.2. Obliczone w próżni za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) wartości BDE [kcal/mol] wiązań O-H w oligomerów i glukozydów TR [188]

Substancja	4-O-H	4'-O-H	2-O-H	2'-O-H	3-O-H	3'-O-H	1-OH	5-O-H	5'-O-H
TR	–	78,683	–	–	82,876	–	–	82,876	–
<i>Trans</i> -4,4'-DHS	77,663	77,663	–	–	–	–	–	–	–
Dimer <i>trans</i> -4,4'-DHS	77,392	–	83,095	–	–	–	82,085	–	–
<i>Trans</i> -ε-winiferyna	78,398	–	82,582	–	82,846	82,846	82,763	–	–
<i>Cis</i> -ε-winiferyna	79,871	–	82,479	–	82,678	–	82,753	–	–
<i>Trans</i> -δ-winiferyna-A	83,151	–	82,632	–	82,709	–	82,632	82,709	–
<i>Trans</i> -δ-winiferyna-B	96,601	–	96,956	–	96,004	–	96,956	96,004	–
Gnetina H	77,972	82,805	–	–	82,795	82,795	82,805	82,795	82,795
Pallidol	81,764	81,746	81,303	81,303	80,906	80,906	–	–	–
<i>Trans</i> -piceid	–	78,004	–	–	–	–	–	84,562	–
<i>Cis</i> -piceid	–	78,962	–	–	–	–	–	83,354	–
<i>Trans</i> -astringina	–	69,464	–	–	–	83,786	–	83,889	–
3-O-glukuronian TR	–	78,883	–	–	–	–	–	84,072	–
<i>Trans</i> -resveratrol-4'-O-β-D-glukopiranozyd	–	–	–	–	84,764	–	–	84,764	–
Suffruticosol B	80,352	80,353	80,349	80,348	80,350	80,352	–	80,351	80,351

Tabela 4.17.3. Obliczone w próżni za pomocą uB3LYP/6-311G(d,p) gęstości spinowe na atomach tlenu glukozydów, 3-O-glukuronianu TR oraz na atomie O4' oligomerów TR [188]

Przeciwutleniacz	O4'	O3'	O5
TR	0,3529	–	0,4488
<i>Trans</i> -4,4'-DHS	0,3424	–	–
<i>Trans</i> -piceid	0,3486	–	0,4679
<i>Cis</i> -piceid	0,3694	–	0,4539
<i>Trans</i> -astringina	0,3332	0,4378	0,4697
3-O-glukuronian TR	0,3537	–	0,4645
<i>Trans</i> -resveratrol-4'-O-β-D-glukopiranozyd	–	–	0,4734
Dimer <i>trans</i> -4,4'-DHS	0,3388	–	–
Pallidol	0,4357	–	–
<i>Trans</i> -ε-winiferyna	0,3480	–	–
<i>Cis</i> -ε-winiferyna	0,3734	–	–
<i>Trans</i> -δ-winiferyna-A	0,4478	–	–
<i>Trans</i> -δ-winiferyna-B	0,4476	–	–
Gnetina H	0,3489	–	–
Suffruticosol B	0,4287	–	–

Tabela 4.17.4. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311++G(3df,2p) wartości AIP [kcal/mol] oraz BDE [kcal/mol] dla siarczanów(VI) TR oraz TR

Substancja	AIP (próżnia)	BDE 4'-O-H (próżnia)	BDE 3-O-H (próżnia)	BDE 5-O-H (próżnia)	AIP (woda)	BDE 4'-O-H (woda)	BDE 3-O-H (woda)	BDE 5-O-H (woda)
4.6.3.a	165,87	–	75,421	75,423	132,567	–	79,769	79,332
4.6.3.b	163,01	74,215	–	75,923	130,679	78,654	–	79,776
4.6.3.c	169,50	74,988	–	–	137,521	78,876	–	–
4.6.3.d	171,522	–	–	75,903	140,432	–	–	79,689
4.6.3.e	177,72	–	–	–	143,245	–	–	–
TR	160,207	76,858	77,325	77,327	123,541	87,043	88,855	88,895

Tabela 4.18.1. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) wartości AIP [kcal/mol] oraz BDE [kcal/mol] wiązania 4'-O-H polifenoli wyizolowanych z orzecha ziemnego

Substancja	AIP (próżnia)	4'-O-H (próżnia)	AIP (woda)	4'-O-H (woda)
<i>Trans</i> -arachidin-1	146,40	69,621	124,75	70,897
<i>Trans</i> -arachidin-2	147,02	78,016	126,8	79,564
<i>Trans</i> -arachidin-3	146,92	78,055	124,98	79,679
<i>Trans</i> -3'-izopentadienylo-3,5,4'-trihidroksystilben	153,85	73,707	131,21	74,775

Tabela 4.19.1. Obliczone w próżni i medium wodnym za pomocą B3LYP/6-311G(d,p) wartości BDE [kcal/mol] wiązań O-H oraz AIP [kcal/mol] TR, PC, pterostilbenu, hydropterostilbenu, rapontygeniny oraz izorapontygeniny

Substancja	3'-O-H (próżnia)	3-O-H (próżnia)	4'-O-H (próżnia)	3'-O-H (woda)	3-O-H (woda)	4'-O-H (woda)	AIP (próżnia)	AIP (woda)
TR	–	79,651	78,683	–	81,121	80,728	157,06	118,94
Pterostilben	–	–	83,725	–	–	84,964	153,32	115,76
PC	75,082	77,988	77,643	76,231	78,643	78,321	150,32	110,43
Rapontygenina	–	83,197	82,321	–	84,124	83,089	152,45	108,77
Izorapontygenina	80,789	80,342	–	81,785	81,236	–	152,78	108,95
Hydropterostilben	81,456	–	80,976	82,886	–	81,907	151,76	107,54

6. LITERATURA

- [1] Ragab AS (2006): Detection and quantitation of resveratrol in tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). J Agric Food Chem, 54: 7175-7179.
- [2] Counet C i wsp. (2006): Chocolate and cocoa: new sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. Food Chem, 98: 649-657.
- [3] Jerkovic V i wsp. (2005): Determination of stilbenes in hop pellets from different cultivars. J Agric Food Chem, 53: 4202-4206.
- [4] Sun X i wsp. (2008): Measurement and correlation of stability of *trans*-resveratrol in 11 solvents at T = (278.2, 288.2, 298.2 and 318.2) K. J Chem Thermodynamics, 40: 735-738.
- [5] Schöppner A, Kindl H (1984): Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. J Biol Chem, 259: 6806-6811.
- [6] Roberti M i wsp. (2003) Synthesis and biological evaluation of resveratrol and analogs as apoptosis-inducing agents. J Med Chem, 46: 3546-3554.
- [7] Waffo-Teguo P i wsp. (2001): Potential cancer- chemopreventive activities of wine stilbenoids and flavans extracted from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. Nutr Cancer, 40: 173.
- [8] Deak M, Falk H (2003): On the chemistry of resveratrol diastereomers. Monat für Chem, 134: 883-888.
- [9] Trela B, Waterhouse A (1996): Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. J Agric Food Chem, 44: 1253-1257.
- [10] Vian MA i wsp. (2005): Simple and rapid method for *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. J Chrom, 1085: 224-229.
- [11] Babu SK i wsp. (2005): Estimation of *trans*-resveratrol in herbal extracts and dosage forms by high-performance thin-layer chromatography. Chem Pharm Bull, 53: 691-693.
- [12] Goldberg DM i wsp. (1994): Direct-injection gas chromatographic mass-spectrometric assay for *trans*-resveratrol. Anal Chem, 66: 3959-3963.
- [13] Rolfs CH, Kindl H (1984): Stilbene synthase and chalcone synthase. Plant Physiol, 75: 489-492.
- [14] Sotheeswaran S, Pasupathy V (1993): Distribution of resveratrol oligomers in plants. Phytochemistry, 32: 335-338.
- [15] Ito T i wsp. (2001): A novel bridged stilbenoid trimer and four highly condensed stilbenoid oligomers in *Vatica rassak*. Tetrahedron, 57: 7309-7321.
- [16] Ito T i wsp. (2001): A new resveratrol octamer, vateriaphenol A in *Vateria indica*. Tetrahedron Lett, 42: 5909-5912.
- [17] Huang KS I wsp: Stilbene dimers from the lianes of *Gnetum hainanense*. Phytochemistry, 54: 875-881.
- [18] Romero-Pérez AI i wsp. (1999): Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. J Agric Food Chem, 47: 1533-1536.
- [19] Burns J i wsp. (2002): Plant foods and herbal sources of resveratrol. J Agric Food Chem, 50: 3337-3340.
- [20] Takaoka M (1939): Resveratrol, a new phenolic compound from *Veratrum grandiflorum*. J Chem Soc Jap, 60: 1090-1100.
- [21] Langcake P, Pryce RJ (1976): The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. Physiol Plant Pathol, 9: 77-86.

- [22] Asensi M i wsp. (2002): Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its bio-availability. *Free Radic Biol Med*, 33: 387.
- [23] Juan ME i wsp. (1999): Determination of *trans*-resveratrol in plasma by HPLC. *Anal Chem*, 71:747-750.
- [24] Lamuela-Raventós RM i wsp. (1995): Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *J Agric Food Chem*, 43: 281-283.
- [25] Ribeiro de Lima MT i wsp. (1999): Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and *trans*-piceid and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. *J Agric Food Chem*, 47: 2666-2670.
- [26] Aumont V i wsp. (2001): Regioselective and stereospecific glucuronidation of *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol in human. *Archives Biochem and Biophys*, 393: 281-289.
- [27] Meng X i wsp. (2004): Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J Agric Food Chem*, 52: 935-942.
- [28] Wenzel E i wsp. (2005): Bioactivity and metabolism of *trans*-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol Nutr Food Res*, 49, 482-494.
- [29] Walle T i wsp. (2004): High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*, 32: 1377-1382.
- [30] Andlauer W i wsp. (2000): Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. *Drugs Exp Clin Res*, 26: 47-55.
- [31] Henry C i wsp. (2005): Cellular uptake and efflux of *trans*-piceid and its aglycone *trans*-resveratrol on the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J Agric Food Chem*, 53: 798-803.
- [32] Bertelli AA i wsp. (1996): Kinetics of *trans*- and *cis*-resveratrol after red wine oral administration in rats. *Int J Clin Pharmacol Res*, 16: 77-81.
- [33] Guebailia AM i wsp. (2006): Hopeaphenol: The first tetramer wines from North Africa. *J Agric Food Chem*, 54: 9559-9564.
- [34] Renaud S, Lorgeil M (1992): Alcohol, platelets and French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339:1523-1526.
- [35] Bertelli AE i wsp. (2002): Resveratrol, component of wines and grapes, in the prevention of kidney disease. *Ann N Y Acad Sci*, 957: 230-238.
- [36] Sanders TH i wsp. (2000): Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *J Agric Food Chem*, 47: 1243-1246.
- [37] Sobolev VS, Cole M (1999): *Trans*-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *J Agric Food Chem*, 47: 1435-1439.
- [38] Ibern-Gómez M i wsp.(2000): Resveratrol and piceid levels in natural blended peanut butters. *J Agric Food Chem*, 48: 6352-6354.
- [39] Lyons MM i wsp. (2003): Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *J Agric Food Chem*, 51: 5867-5870.
- [40] Rimando AM i wsp. (2004): Resveratrol, pterostilbene and piceatannol in vaccinium berries, 52: 4713-4719.
- [41] Brinker AM, Seigler DS (1991): Isolation and identification of piceatannol as a phytoalexin from sugarcane. *Phytochemistry*, 30: 3229-3232.
- [42] Bavaresco L i wsp. (2003): Effect of ochratoxin A-producing *Aspergilli* on stilbenic phytoalexin synthesis in grapes. *J Agric Food Chem*, 51: 6157-6158.
- [43] Bavaresco L i wsp. (1999): Stilbene compounds from the grapevine to wine. *Drugs Exp Clin Res*, 25: 57-63.

- [44] Inamori Y i wsp. (1984): Physiological activities of 3,3',4,5'-tetrahydroxystilbene isolated from heartwood of *Cassia garrettiana*. Chem Pharm Bull, 32: 213-218.
- [45] Piver B i wsp. (2004): Involvement of Cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. Biochem Pharmacol, 68: 773-782.
- [46] Potter GA i wsp. (2002): The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anti-cancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. Br J Cancer, 86: 774-778.
- [47] Skinnider L, Stoessl A (1986): The effect of the phytoalexins, lubimin, maackiain, a pinosylvin and the related compounds dehydroloroglossol and hordatine M on human lymphoblastoid cell lines. Experientia, 42: 568-570.
- [48] Preising-Mueller R i wsp. (1999): Characterization of a pine multigene family containing elicitor-responsive stilbene synthase genes. Plant Mol Biol, 39: 221-229.
- [49] Matsuda H i wsp. (2000): Effects of stilbene constituents from rhubarb on nitric oxide production in lipopolysaccharides-activated macrophages. Bioorg Med Chem, 10: 323-327.
- [50] Matsuda H i wsp. (2001): Study on anti-Oketsu activity on rhubarb II. Anti-allergic effects of stilbene components from *Rhei undulati* Rhizoma Biol Pharm Bull, 24: 264-267.
- [51] Park EK i wsp. (2002): Anti-thrombotic and anti-allergic activities of rhaponticin from *Rhei Rhizoma* are activated by human intestinal bacteria. Arch Pharm Res, 25: 528-533.
- [52] Adrian M i wsp. (2000): Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection high performance liquid chromatography. Am J Enol Vitic, 2000: 51:37-41.
- [53] Paul B i wsp. (1999): Occurrence of resveratrol and pterstilbene in age-old darakchasa-va, an ayurvedic medicine from India. J Ethnopharmacology, 68: 71-76.
- [54] Ovensa Z i wsp. (2006): Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol, and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cells. Oncology Reports, 16: 617-624.
- [55] Olas B i wsp. (2001): Antioxidant activity of resveratrol in endotoxin-stimulated blood platelets. Cell Biol Toxic. 17, 117-125.
- [56] Lu M i wsp. (2002): Efficiency and structure-activity relationship of the antioxidant action of resveratrol and its analogs. Pharmazie, 57: 474-478.
- [57] Frenkel EN i wsp. (1993): Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. Lancet, 341: 1103-1104.
- [58] Miura T i wsp. (2000): Antioxidative and prooxidative action of stilbene derivatives. Pharmacol Toxicol, 86: 203-208.
- [59] Frémont L i wsp. (2000): Biological effects of resveratrol. Life Sci, 66: 663-673.
- [60] Fukuhara K, Miyata N (1998): Resveratrol as a new type DNA-cleaving agent. Bioorg Med Chem Lett, 8: 3187-3192.
- [61] Fukuhara K i wsp. (2006): Structural basis for DNA-cleaving activity of resveratrol in the presence of Cu(II). Bioorg Med Chem, 14(5):1437-1443.
- [62] Zini R i wsp. (2002): Resveratrol-induced limitation of dysfunction of mitochondria isolated from rat brain in an anoxiareoxygenation model. Life Sci, 26:(3091-3108.
- [63] Shang YJ i wsp. (2009): Radical-scavenging activity and mechanism of resveratrol-oriented analogues: influence of solvent, radical, and substitution. J Org Chem, 17: 5025-5031.
- [64] Wang M i wsp. (1999): Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product resveratrol and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. J Agric Food Chem, 47(10): 3974-3977.

- [65] Fang J-G i wsp. (2002): Antioxidant Effects of resveratrol and its analogues against the free radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. *Chem Eur J*, 8: 4191-4198.
- [66] Murias M i wsp. (2005): Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. *Biochem Pharmacology*, 69: 903-912.
- [67] Lorenz P i wsp. (2003): Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidant and free radical scavengers: effect on nitrosative oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide*, 9: 64-76.
- [68] Hsieh T-C i wsp. (1999): Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21, and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G₂. *Cancer Res*, 59: 2596-2601.
- [69] Leiro J i wsp. (2004): Effects of *cis*-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. *J Leukocyte Biol*, 75: 1156-1165.
- [70] Fragopoulou E i wsp. (2007): Biological activity of acetylated phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 55: 80-89.
- [71] Buryanovskyy L i wsp. (2004): Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol. *Biochem*, 14: 11417-11426.
- [72] Cao Z, Li Y (2004): Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzyme by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur J Pharmacol*, 5: 39-48.
- [73] Kaneider NC i wsp. (2004): Inhibition of thrombin-induced signaling by resveratrol and quercetin: effects on adenosine nucleotide metabolism in endothelial cells and platelet-nutrophil interactions. *Tromb Res*, 114: 185-194.
- [74] Fukao H i wsp. (2004): Effect of *trans*-resveratrol on the thrombogenicity and atherogenicity in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 15: 441-446.
- [75] Hung LM i wsp. (2001): Beneficial effects of astringinin, a resveratrol analogue on the ischemia and reperfusion damage in rat heart. *Free Rad Biol Med*, 30: 877-883.
- [76] Seidman M i wsp. (2003): Effects of resveratrol on acoustic trauma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 129: 463-470.
- [77] Waffo-Teguo J i wsp. (1998): Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucoside newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *J Nat. Prod*, 61: 655-657.
- [78] Lee SK i wsp. (1998): Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb Chem High Throughput Screen*, 1: 35-46.
- [79] Amorati R i wsp. (2004): Anti-oxidant activity of hydroxystilbene derivatives in homogeneous solution. *J Org Chem*, 69: 7101-7107.
- [80] Manickam M i wsp. (1997): Anti-hyperglycemic activity of phenolics from *Pterocarpus tessmanii*. *J Nat Prod*, 60: 609-610.
- [81] Stivala LA i wsp. (2001): Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J Biol Chem*, 276: 22586-22594.
- [82] Arichi H i wsp. (1982): Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et. Zucc. on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull*, 30: 1766-1770.
- [83] Turrens JF i wsp. (1997): Resveratrol has no effect on lipoprotein profile and does not prevent peroxidation of serum lipids in normal rats. *Free Radic Res Commun*, 27: 557-562.

- [84] Jang M i wsp. (1997): Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275: 218-220.
- [85] Szewczuk LM i wsp. (2004): Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *J Biol Chem*, 279: 22727-22737.
- [86] Aziz MH i wsp. (2003): Cancer chemopreventive by resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies and the underlying mechanisms. *J Chem Biol*, 23: 17-28.
- [87] Dong Z (2003): Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res*, 523-524: 145-150.
- [88] Ito T i wsp. (2003): Anti-tumor effect of resveratrol oligomers against human cancer cell lines and the molecular mechanism of apoptosis induced by vaticanol C. *Carcinogenesis*, 24: 1489-1497.
- [89] Fulda S, Debatin KM (2004): Sensitization for anticancer drug – induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene*, 2, 23, 40: 6702-1671.
- [90] Fuggetta MP i wsp.(2004): *In vitro* antitumour activity of resveratrol in human melanoma cells sensitive or resistant to temozolomide. *Melanoma Res*, 14: 189-196.
- [91] Baatout S i wsp. (2004): Enhanced radiation-induced apoptosis of cancer cell lines after treatment with resveratrol. *Int J Med Chem*. 13: 895-902.
- [92] Lu R, Serrero G (1999): Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *J Cell Physiol*, 179(3): 297-304.
- [93] Laux MT i wsp. (2004): Identification of a p53-dependent pathway in the induction of apoptosis in human breast cancer cells by the natural product, resveratrol. *J Altern Complement Med*, 10: 235-239.
- [94] Lontas A, Yeger H (2004): Curcumin and resveratrol induce apoptosis and nuclear translocation and activation of p53 in human neuroblastoma. *Anticancer Res*, 24: 987-998.
- [95] Bruno R i wsp. (2003): Wine and tumors: study of resveratrol. *Drugs Exp Clin Res*, 29: 257-261.
- [96] Opipari AW i wsp. (2004): Resveratrol – induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res*, 15: 696-703.
- [97] Reagan-Shaw S i wsp. (2004): Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin. *Oncogene*, 23: 5151-5160.
- [98] Ferrer P i wsp. (2005): Association between pterostilbene and quercetin inhibits metastatic activity of B16 melanoma. *Neoplasia*, 1: 37-47.
- [99] Roberti M i wsp. (2003): Synthesis and biological evaluation of resveratrol and analogs as apoptosis-inducing agents. *J Med Chem*, 46: 3546-3554.
- [100] Tolomeo M i wsp. (2005): Pterostilbene and 3'-hydroxypterostilbene are effective apoptosis-inducing agents in MDR and BCR-ABL-expressing leukemia cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 1709-1726.
- [101] Rimando AM i wsp. (2002): Cancer chemopreventive and anti-oxidant activities of pterostilbene, a natural occurring analogue of resveratrol. *J Agric Food Chem*, 50: 3453-3457.
- [102] Barton B i wsp. (2004): Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol Cancer Ther*, 3: 11-20.

- [103] Kimura Y i wsp. (2000): Inhibitory effects of active substances isolated from *Cassia garrettiana* heartwood on tumor growth and lung metastasis in Lewis lung Carcinoma-bearing mice. *Anti-cancer Res*, 20: 2923-2930.
- [104] Wieder F i wsp. (2001): Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemoprotective agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblast. *Leukemia*, 15: 1735-1742.
- [105] Roupe KA i wsp. (2004): Anti-cancer activity pharmacokinetics and metabolism of piceatannol. *J Pharm Pharm Sci*, 7: 92-185.
- [106] Chun YJ I wsp. (2000): Mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A1 by rhapontigenin. *Drug Met Disp*, 29: 389-393.
- [107] Guengerich FP i wsp. (2003): A target for inhibition in anticarcinogenesis strategies. *Mut Res*, 183: 523-524.
- [108] Donnelly LE i wsp. (2004): Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287: 774-783.
- [109] Chen G i wsp. (2005): Synthesis and anti-inflammatory activity of resveratrol analogs. *Chem Pharm Bull*, 53(12): 1587-1590.
- [110] Martin AG i wsp. (2004): Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase 2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship. *Bioorg Med Chem*, 1: 5571-5578.
- [111] Kimura Y i wsp. (1985): Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim Biophys Acta*, 834: 275-278.
- [112] Fan X, Mattheis JP (2006): Inhibition of oxidative and antioxidative enzymes by *trans*-resveratrol. *J Food Sci*, 66: 200-203.
- [113] Wang LX i wsp. (2004): Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *J Pharm Sci*, 93: (1399-1410).
- [114] Evers DL i wsp. (2004): 3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene (resveratrol) inhibits human cytomegalovirus replication and virus induced cellular signaling. *Antiviral Res*, 63: 2448-2457.
- [115] Docherty JJ i wsp. (2004): Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice. *Antiviral Res*, 61: 19-26.
- [116] Chang JS i wsp. (2005): Ethanol extract of *Polygonum cuspidatum* inhibits hepatitis B virus in a stable HBV-producing cell line. *Antiviral Res*, 66: 29-34.
- [117] Heredia A i wsp. (2000): Synergistic inhibition of HIV-1 activated and resting peripheral blood mononuclear cells, monocyte-derived macrophages, and selected drug-resistant isolates with nucleoside analogues combined with a natural product, resveratrol. *J Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 25: 246-255.
- [118] Byun HS i wsp. (2008): Caspase-8 an essential role in resveratrol induced apoptosis of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology*, 47(3): 301-308.
- [119] Clement MV i wsp. (1998): Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood*, 92: 996-1002.
- [120] Bernhard D i wsp. (2000): Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to FAS-independent apoptosis in CEM-C7H2 acute leukemia cells. *Cell Death Differ*, 7: 834-842.
- [121] Delmas D i wsp. (2003): Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem*, 278: 41482-41490.

- [122] Dorrie J i wsp. (2001): Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia Cells. *Cancer Res* 61: 4731-4739.
- [123] Tinhofer I i wsp. (2001): Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl. *FASEB J*, 15: 1613-1615.
- [124] Zheng J i wsp. (1999): Piceatannol, a Stilbene Phytochemical, Inhibits Mitochondrial F0F1-ATPase Activity by Targeting the F1 Complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 261: 499-503.
- [125] Adhami VM i wsp. (2001): Involvement of the retinoblastoma (pRb)-E2F/DP pathway during antiproliferative effects of resveratrol in human epidermoid carcinoma (A431) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 288: 579-585.
- [126] Kim YA i wsp. (2003): Involvement of p21WAF1/CIP1, pRB, Bax and NF-kappaB in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells. *Int J Oncol*, 23(4): 1143-1149.
- [127] Huang C i wsp. (1999): Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis*, 20: 237-242.
- [128] Lu J i wsp. (2001): Resveratrol analog, 3,4,5,4'-tetrahydroxystilbene, differentially induces pro-apoptotic p53/Bax gene expression and inhibits the growth of transformed cells but not their normal counterparts. *Carcinogenesis*, 2: 321-328.
- [129] Scarlatti F i wsp. (2003): Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via *de novo* ceramide signaling. *FASEB J*, 17(15): 2339-2341.
- [130] Schneider Y i wsp. (2003): Resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization. *Int J Cancer*, 107: 189-196.
- [131] El-Mowafy A, Alkhalaf M (2003): Resveratrol activates adenyllyl-cyclase in human breast cancer cells: a novel, estrogen receptor-independent cytostatic mechanism. *Carcinogenesis*, 24: 869-873.
- [132] Baek JS i wsp. (2002): Resveratrol enhances the expression of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) by increasing the expression of p53. *Carcinogenesis*, 23: 425-432.
- [133] Billard C i wsp. (2002): Comparative antiproliferative and apoptotic effects of Resveratrol, ϵ -viniferin and vine-shots derived polyphenols (*Vineatrols*) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leuk Lymphoma*, 43(10): 1991-2002.
- [134] Roman V i wsp. (2002): Analysis of resveratrol-induced apoptosis in human B-cell chronic leukaemia. *Br J Haematol*, 117: 842-851.
- [135] Mahyar-Roemer M i wsp. (2001): Resveratrol induces colon tumor cell apoptosis independently of p53 and precede by epithelial differentiation, mitochondrial proliferation and membrane potential collapse. *Int J Cancer*, 94: 615-622.
- [136] Wolter F, Stein J (2002): Resveratrol enhances the differentiation induced by butyrate in Caco-2 colon cancer cells. *J Nutr*, 132: 2082-2086.
- [137] Liang YC i wsp. (2003): Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Pharmacol*, 65: 1053-1060.
- [138] Ding XZ, Adrian TE (2002): Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Pancreas*, 25: e71-76.
- [139] Atten MJ i wsp. (2001): Resveratrol-induced inactivation of human gastric adenocarcinoma cells through a protein kinase C-mediated mechanism. *Biochem Pharmacol*, 62: 1423-1432.

- [140] Holian O i wsp. (2002): Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Gastrointest Liver*, 282: G809-816.
- [141] Hsieh TC, Wu JM (2000): Grape-derived chemopreventive agent resveratrol decreases prostate-specific antigen (PSA) expression in LNCaP cells by an androgen receptor (AR)-independent mechanism. *Anticancer Res*, 20: 225-228.
- [142] Lin HY i wsp. (2002): Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. *J Urol*, 168: 748-755.
- [143] Mitchell SH i wsp. (1999): Resveratrol inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*, 59: 5892-5895.
- [144] Kampa M i wsp. (2000): Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer*, 37: 223-233.
- [145] Delmas D i wsp. (2000): Inhibitory effect of resveratrol on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines. *Oncol Rep*, 7: 847-852.
- [146] Kozuki Y i wsp. (2001): Resveratrol suppresses hepatoma cell invasion independently of its anti-proliferative action. *Cancer Lett*, 167: 151-156.
- [147] De Lédighen V i wsp. (2001): Trans-resveratrol, a grapevine-derived polyphenol, blocks hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol*, 19: 83-88.
- [148] Shih A i wsp. (2002): Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK- and p53-dependent mechanism. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 1223-1232.
- [149] Elattar TM, Virji AS (1999): The effect of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Anticancer Res*, 19: 5407-5414.
- [150] Sgambato R i wsp. (2001): Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat Res*, 20: 171-180.
- [151] Ahmad A i wsp. (2005): Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicol Lett*, 159: 1-12.
- [152] Caruso F i wsp. (2004): Structural basis for antioxidant activity of *trans*-resveratrol: *ab initio* calculations and crystal and molecular structure. *J Agric Food Chem*, 52: 7279-7285.
- [153] Bernard E i wsp. (2007): Resveratrol photoisomerization: An integrative guided-inquiry experiment. *J Chem Educ*, 84: 1159-161.
- [154] Xu S i wsp. (2007): A DMol³ study on the reaction between trans-resveratrol and hydroperoxyl radical. Dissimilarity of antioxidant activity among O-H groups of trans-resveratrol. *J Mol Struc: THEOCHEM*, 809: 79-85.
- [155] Billes F i wsp. (2007): Vibrational spectroscopy of resveratrol. *Spectrochimica Acta Part A*, 68: 669-679.
- [156] Del Nero J, de Melo PC (2003): Quantum chemistry calculations of resveratrol and related stilbenes. *Opt Materials*, 21: 455-460.
- [157] Queiroz AN i wsp. (2009): A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. *Eur J Med Chem*, 44: 1644-1649.
- [158] Cao H i wsp. (2003): Density functional theory calculations for resveratrol. *Bioorg Med Chem Lett*, 13: 1869-1871.
- [159] Wright JS i wsp. (2001): Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc*, 123: 1173-1183.
- [160] Leopoldini M i wsp. (2004): Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. *J Phys Chem A*, 108: 4916-4922.
- [161] Kim HJ i wsp. (1998): Lipooxygenase inhibition and antioxidative activity of flavonoids from *Paeonia montan* sseds. *J Food Sci Nutr*, 3: 315-319.

- [162] Kim HJ i wsp. (2002): Cytotoxic and antimutagenic stilbenes from seeds of *Paeonia lactiflora*. Arch Pharm Res, 25: 293-299.
- [163] Kim HJ i wsp. (2002): Antioxidative activity of resveratrol and its derivatives isolated from seeds of *Paeonia lactiflora*. Biosci Biotechnol Biochem, 66: 1990-1993.
- [164] Privat C i wsp. (2002): Antioxidant properties of *trans*- ϵ -viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous Media. J Agric Food Chem, 50: 1213-1217.
- [165] Vitrac X i wsp. (2005): Determination of stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astralingin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, epsilon-viniferin) in brazilian wines. J Agric Food Chem, 53: 5664-5669.
- [166] Guebailia HA i wsp. (2009): Centrifugal partition chromatography followed by HPLC for the isolation of *cis*- ϵ -viniferin, a resveratrol dimer newly extracted from a red Algerian wine. Food Chem, 113: 320-324.
- [167] He S i wsp. (2009): Pallidol, a resveratrol dimer from red wine, is a selective singlet oxygen quencher. J Agric Food Chem, 379: 283-287.
- [168] Fabris S i wsp. (2008): Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. Biophys Chem, 135: 76-83.
- [169] Fauconneau B i wsp. (1997): Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests. Life Sci, 61: 2103-2110.
- [170] Pezet R i wsp. (2003): δ -Viniferin, a Resveratrol dehydrodimer: One of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. J Agric Food Chem, 51: 5488-5492.
- [171] De Lima R i wsp. (1999): Determination of stilbenes (*trans*-astralingin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. J Agric Food Chem, 47: 2660-2670.
- [172] Geriogianniki-Christopoulou M (2008): Evaluation of methanol concentration in Hellenic traditional alcoholic beverages after grape pomace formation at different conditions. J Food Technol, 6: 196-202.
- [173] Goldberg DM i wsp. (1997): Identification and assay of trihydroxystilbenes in wine and their biological properties. Symposium Series, 24-43.
- [174] Faustino RS i wsp. (2003): Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American Merlot red wines. Moll Cell Biochem, 249: 11-19.
- [175] Tedesco I i wsp. (2000): Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. J Nutr Biochem, 111: 114-119.
- [176] Sobolev VS i wsp. (2009): New stilbenoids from peanut (*Arachis hypogaea*) seeds challenged by an *Aspergillus caelatus* strain. J Agric Food Chem, 57: 62-68.
- [177] Chang J-C i wsp. (2006): Biosynthesis enhancement and antioxidant and anti-inflammatory activities of peanut (*Arachis hypogaea* L.) arachidin-1, arachidin-3, and isopentadienylresveratrol. J Agric Food Chem, 54: 10281-10287.
- [178] Chen X, Reynolds CH (2002): Performance of similarity measures in 2D fragment-based similarity searching: comparison of structural descriptors and similarity coefficients. J Chem Inf Comp Sci, 42: 1407-1414.
- [179] Füllbeck M i wsp. (2005): Novel curcumin – emodin-related compounds by *in silico* 2D/3D conformer screening induce apoptosis in tumor cells. BMC Cancer, 5: 1-14.
- [180] Frisch MJ i wsp. (2003): Gaussian 03 Gaussian Inc Pittsburgh PA.
- [181] Hohenberg K, Kohn W (1964): Inhomogeneous Electron Gas. Phys Rev, 136: B864-B871.
- [182] Møller C, Plesset MP (1934): Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems. Phys Rev, 46: 618-622.

- [183] Mulliken R (1967): Spectroscopy, Molecular Orbitals, and Chemical Bonding. Science, 157: 13-24.
- [184] Burda JV i wsp. (2005): Theoretical model of the aqua-copper $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_5]^+$ cation interactions with guanine. J Mol Model, 11: 362-369.
- [185] Cossi M i wsp. (2003): Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. J Comp Chem, 24: 669-681.
- [186] Klamt A, Schüürmann G (1993): COSMO: A new approach to dielectric screening in solvents with explicit expression for screening energy and its gradient. J Chem Soc Perkin Trans, 2: 799.
- [187] Mikulski D i wsp. (2010): A theoretical study of the structure-radical scavenging activity of *trans*-resveratrol analogues and *cis*-resveratrol in gas phase and water environment. Eur J Med Chem, 45: 1015-1027.
- [188] Mikulski D, Molski M (2010): Quantitative structure-antioxidant activity relationship of *trans*-resveratrol oligomers, *trans*-4,4'-dihydroxystilbene dimer, *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide, glucosides: *trans*-piceid, *cis*-piceid, *trans*-astringin and *trans*-resveratrol-4'-O-beta-D-glucopyranoside. Eur J Med Chem, 45: 2366-2380.
- [189] Mikulski D i wsp. (2010): Quantum-chemical study on the antioxidations mechanisms of *trans*-resveratrol reactions with free radicals in the gas phase, water and ethanol medium. J Mol Struct: THEOCHEM, 951: 37-48.
- [190] Jensen J (2007). Introduction to computational chemistry. Willey, London.
- [191] Becke AD (1988): Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. Phys Rev A, 38: 3098-3100.
- [192] Lee C i wsp. (1988): Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. Phys Rev B, 37: 785-789.
- [193] Becke TL i wsp. (2000): Real-space mesh techniques in density-functional theory. Rev Mod Phys, 72: 1041-1080.
- [194] Boys SF, Bernardi F (1970): The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. Mol Phys, 19: 553-566.
- [195] López-Nicolás JM, García-Carmona F (2008): Aggregation state and pKa values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption. J Agric Food Chem, 58: 7600-7605.
- [196] Rossi M i wsp. (2008): Crystal and molecular structure of piceatannol; scavenging features of resveratrol and piceatannol on hydroxyl and peroxy radicals and docking with transthyretin. J Agric Food Chem, 56: 10557-10566.
- [197] Kwasniewski SP i wsp. (2003): High level theoretical study of the structure and rotational barriers of *trans*-stilbene. J Chem Phys, 118: 7823.
- [198] Fan GJ i wsp. (2009): 4,4'-dihydroxy-*trans*-stilbene, a resveratrol analogue, exhibited enhanced antioxidant activity and cytotoxicity. Bioorg Med Chem, 17: 2360-2365.
- [199] Berg J, Tymoczko JL, Streeter L (2007). Biochemia. PWN, Warszawa.
- [200] Kang JH i wsp. (2003): Resveratrol derivatives potently induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. Exp Mol Chem, 35: 467-475.
- [201] Zhou HB i wsp. (2005): Anticancer activity of resveratrol on implanted human primary gastric carcinoma cells in nude mice. J Gastroenterology, 11: 280.
- [202] Fontecave M i wsp. (1998): Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. FEBS Lett, 421: 277-279.
- [203] Fritzer-Szekeres M i wsp. (2008): Biochemical effects of piceatannol in human HL-60 promyelocytic leukemia cells-synergism with Ara-C. Int J Oncol, 33: 887-892.
- [204] Bartosz G (2006). Druga twarz tlenu. PWN, Warszawa.

- [205] Zdrojewicz Z, Belowska-Bień K (2005): Resveratrol-its activity and clinical role. *Adv Clin Exp Med*, 14,5: 1051-1056.
- [206] Atkins PW (2001). *Chemia fizyczna*. PWN, Warszawa.
- [207] Springborg M (2000). *Methods of Electronic-Structure Calculutions*. John Wiley, London.
- [208] Szabo A, Ostlund N (1996). *Modern Quantum Chemistry*. Mineola, New York.
- [209] Baker J (1988): Møller-Plasset perturbation theory with the AUHF wavefunction. *Chem Phys Lett*, 152: 227-232.
- [210] Schlegel H, Bernhard (1986): Potential energy curves using unrestricted Møller-Plesset perturbation theory with spin annihilation. *J Chem Phys*, 84: 4530-4534.
- [211] Møller C, Plesset MS (1934): Note on an approximation treatment for many-electron systems. *Phys Rev*, 46: 618-622.
- [212] Parr RG, Yang W (1994). *Density-Functional Theory of Atoms and molecules*. Oxford: Oxford University Press.
- [213] Řecha D i wsp. (2002): Intercalators. 1. Nature of stacking intreactions between intercalators (Ethidium, Daunomycin, Ellipticine and 4',6-Diaminide-2-phenylindole) and DNA base pairs. *Ab initio* quantum chemical, density functional theory, and emepirical potential study. *J Am Chem Soc*, 124: 3366-3376.
- [214] Shen Li i wsp. (2009): Stacking interactions and DNA intercalation. *J Phys Chem B*, 113: 11166-11172.
- [215] Mikulski D, Molski M (2010): Quantum chemistry study of interaction of Cu²⁺ cation and aqua-copper [Cu(H₂O)₁₋₄]²⁺ complexes with resveratrol stereoisomers, phospholipid and deoxythymidine 5'-monophoshate. *J Mol Struct: THEOCHEM*, 956: 66-76.
- [216] Gatz SA, Wiesmüller L (2008): Take a break—resveratrol in action on DNA. *Carcinogenesis*, 29: 321-332.
- [217] Jiang Lin Y (2008): Design, synthesis and spectroscopic studies of resveratrol aliphatic acid ligands of human serum albumin. *Biorg Med Chem*, 16: 6406-6414.
- [218] Commodari F i wsp. (2005): Comparison of the phytoestrogen *trans*-resveratrol structures from x-ray diffraction and solution NMR. *Magn Reson Chem*, 43(7): 567-572
- [219] Basly JP i wsp. (2000): Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sci*, 66: 769-777.
- [220] Webb MR i wsp. (2004): Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity. *Biochem J*, 384: 527-541.
- [221] Dolenc J i wsp. (2005): An ab initio QM/MM study of the conformational stability of complexes formed by netropsin and DNA. The importance of van der Waals interactions and hydrogen bonding. *J Mol Struct: THEOCHEM*, 718: 77-85.
- [222] Trouillas P i wsp. (2006): A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chem*, 97(4): 679-688.
- [223] Ferrer i wsp. (1999): Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol*, 6: 775-784.
- [224] Klabunde i wsp. (2000): Rational design of potent human transthyretin amyloid disease inhibitors. *Nat Struct Biol*, 7: 312-321.

Obliczenia kwantowo-mechaniczne zostały wykonane w ramach grantu obliczeniowego nr 60: „Badanie właściwości biofizykochemicznych resweratrolu i jego pochodnych” w Poznańskim Centrum Superkomputerowo – Sieciowym.

PUBLIKACJE



Original article

A theoretical study of the structure–radical scavenging activity of trans-resveratrol analogues and cis-resveratrol in gas phase and water environment

Damian Mikulski^{a,*}, Rafał Górniak^b, Marcin Molski^a^a Department of Theoretical Chemistry, Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, Poland^b Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 June 2009

Received in revised form

11 November 2009

Accepted 20 November 2009

Available online 27 November 2009

Keywords:

Antioxidant

DFT method

Free radicals

Trans-stilbene

Trans-resveratrol

Cis-resveratrol

Water environment

ABSTRACT

Quantum calculations based on the density functional theory (DFT) have been employed to study the relation between the structure and antioxidant activity of trans-resveratrol (TR), cis-resveratrol (CR), trans-4,4'-dihydroxystilbene (trans-4,4'-DHS), trans-3,4-dihydroxystilbene (trans-3,4-DHS), trans-3,4,4'-trihydroxystilbene (trans-3,4,4'-THS), trans-3,4,5-trihydroxystilbene (trans-3,4,5-THS) and α,β -dihydro-3,4',5-trihydroxystilbene (α,β -dihydro-3,4',5-THS) in the gas phase and water environment. We have shown that the antioxidant activity of trans-stereoisomers of the compounds considered is related to their phenoxy radicals showing a planar and semiquinone conformation that allows delocalization of the unpaired electron through the whole trans-stilbene skeleton. The calculations have revealed that trans-3,4-DHS, trans-3,4,4'-THS, trans-3,4,5-THS and trans-4,4'-DHS exhibit higher antioxidant activity than TR, while α,β -dihydro-3,4',5-THS and CR are less efficient antioxidants than TR. We have proved that all compounds have higher ability to donate hydrogen atom in the gas phase than in the presence of water medium in which they are very sensitive to electron donation. The results obtained demonstrate that the H-transfer mechanism for scavenging of the free radicals is more preferable than the single-electron transfer in both types of environment. They are consistent with the experiments confirming the specific biological activity of the compounds considered.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past few years, several studies have been devoted to the therapeutic properties of TR (trans-3,4',5-trihydroxystilbene, Fig. 1). The most important biological activity of this compound is related to the antioxidant [1–3] and cancer chemo-preventive activity [4,5]. It is a scavenger of free radicals against the peroxidation of low density proteins [6–8] and a potent inhibitor of cyclooxygenase COX-1 and COX-2 in living cells [9]. These properties have been confirmed by Wright et al. [10] with the use of the quantum-mechanical computations in the gas phase and the locally dense basis sets (LDBS), employed in the investigation of the antioxidant activity of several classes of phenolic antioxidants including compounds related to vitamin E, flavonoids, hydroxylated stilbenes and sterically hindered phenols. In this work two pathways of oxidation in which phenolic antioxidants can react with free

radicals have been studied. The results clearly indicate that in most cases H-atom transfer mechanism will be dominant in gas phase.

Theoretical study of the antioxidant properties of trans-resveratrol in the gas phase has been also performed by Cao et al. [11] by making use of B3LYP/6-31G(d,p) level of theory. It has been demonstrated that the 4'-hydroxyl group in this compound is more reactive than the other ones. On the basis of the analysis of the spin density they concluded that 4'-O-radical is more stable than 5-O-radical. Moreover, the authors proved that the antioxidant activity of trans-resveratrol is related to the spin density, unpaired electron distribution on the oxygen atoms and the semiquinone structure of its phenoxy radicals.

Recently, the common theoretical recognition of the antioxidative features of TR and its hydroxylated derivatives was reported by Quieroz et al. [12]. Employing the B3LYP hybrid functional and the 6-31G(d) basis set, they have determined the physical parameters characterizing the antioxidant activity of these compounds in the gas phase. Moreover, in this important study the authors have proved that the antioxidant activity of the polyphenols studied is associated with the stabilization energy of 4'-O

* Corresponding author. Tel.: +48 607608785; fax: +48 8291505.

E-mail address: dmkwant@amu.edu.pl (D. Mikulski).

radicals and that the hydroxyl bond in the para position strongly contributes to the decrease in the parameters characterizing the antioxidant behaviour of the polyphenolic compounds studied.

Parallel to theoretical calculations, some experimental studies of the antioxidant activity of TR and its derivatives have been performed. Recently, Fan et al. [13] synthesized a new antioxidant trans-4,4'-DHS (Fig. 1). In their work the antioxidant activity of this compounds has been analyzed in reactions with the glavinoxyl radical. Also, the geometric properties of trans-4,4'-DHS dimer have been confirmed by spectroscopic methods. The authors claimed that this dimer was an oxidative product of dimerization of TR in the presence of Cu(II). Finally, the experimental results lead to the conclusion that trans-4,4'-DHS possesses stronger antioxidant activity and cytotoxicity against human promyelocytic leukemia cells than TR.

On the basis of the kinetic data Fang et al. [14], investigated the antioxidant effect of TR, trans-3,4-DHS, trans-3,4,4'-THS, trans-3,4,5-THS, trans-4,4'-DHS, trans-4-hydroxystilbene and trans-3,5-DHS, against the peroxidation of linoleic acid in sodium dodecyl sulfate (SDS) and cetyl trimethylammonium (CTAB) micelles. In order to investigate the reactions kinetic, the rate of propagation, chain initiation, peroxide formation, the inhibition period, kinetic chain lengths and inhibition time have been determined. Their results imply that except for trans-4-hydroxystilbene and trans-3,5-dihydroxystilbene, the compounds mentioned are significantly stronger antioxidants than TR. However, trans-3,4,4'-THS has

extremely high antioxidant activity, thus it completely inhibits peroxidation of linoleic acid. It can be seen from Table 9 that trans-3,4-DHS, trans-3,4,4'-THS, trans-3,4,5-THS, trans-4,4'-DHS are less effective antioxidants than TR since they are characterized by a lower values of the oxidation potential than TR. In addition, these authors show that the molecules with ortho-dihydroxyl and para-hydroxyl groups show high antioxidant activity.

The experimental study of the antioxidant activity of TR and its various derivatives was also presented by Stivala et al. [15]. In this work, the antioxidant activity of these molecules was evaluated measuring the inhibition of citronellal thermo-oxidation and the reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. These authors also compared the antioxidant activity of α,β -dihydro-3,4',5-THS and TR and claimed that α,β -dihydro-3,4',5-THS was significantly less active antioxidant than TR. Additionally, in their study based on the values of EC₅₀ and EQ (Table 9) as measures of antioxidant activity it has been demonstrated that CR shows lower antioxidant activity than its trans-stereoisomer.

Considering the above remarks together with the importance of the antioxidative activity of TR, trans-4,4'-DHS, trans-3,4-DHS, trans-3,4,4'-THS, trans-3,4,5-THS and α,β -dihydro-3,4',5-THS (Fig. 1) protection against free radicals, we demonstrate the structure-radical scavenging activity of these compounds in gas phase and aqueous environment by means of the DFT method. To elucidate the geometric stereoisomer-antioxidant activity relation, the computations were performed for trans-resveratrol and CR. Because of the

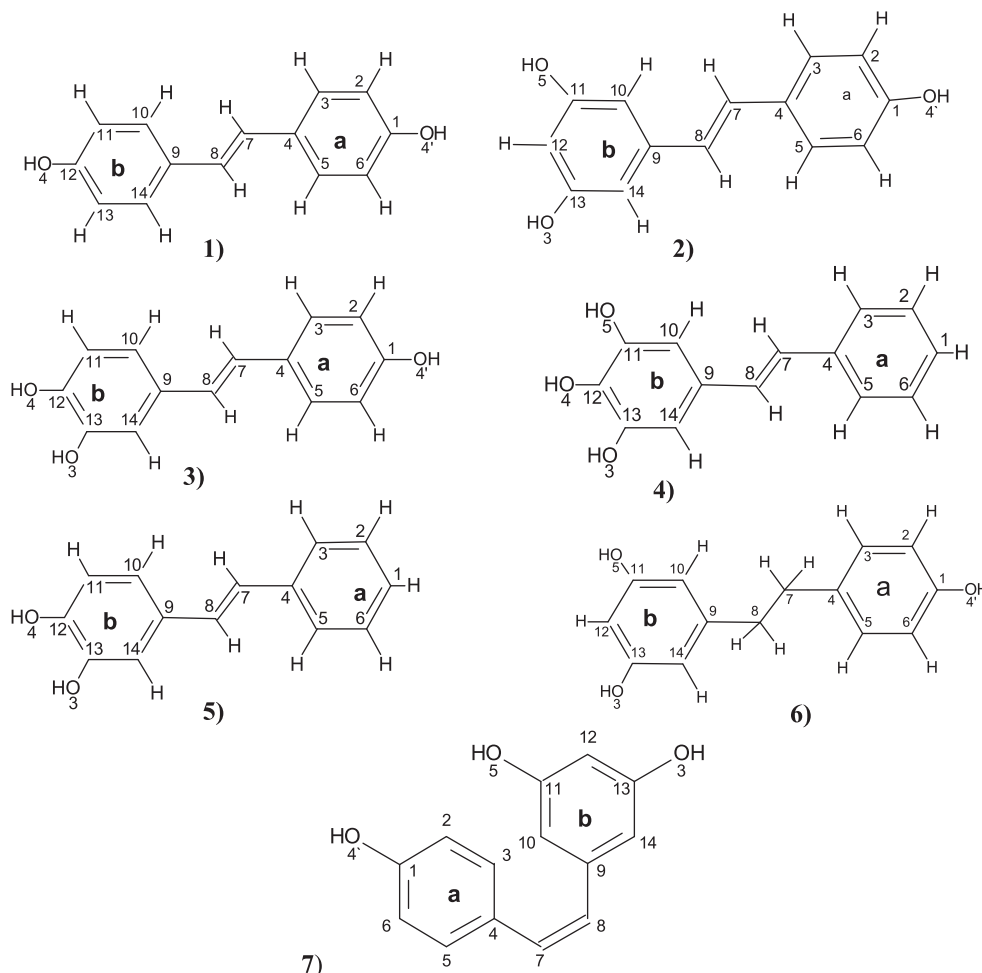


Fig. 1. Molecular structures of trans-4,4'-DHS (1), TR (2), trans-3,4,4'-THS (3), trans-3,4,5-THS (4), trans-3,4-DHS (5), α,β -dihydro-3,4',5-THS (6) and CR (7).

Table 1

The B3LYP/6-311G(d,p) optimized in the gas phase bond lengths [Å], dihedral angles [deg], total energies [hartree] of TR, CR, trans-4,4'-DHS, trans-3,4,5-THS, trans-3,4,4'-THS, trans-3,4-DHS, 4'-O-radical of trans-TR, 4'-O-radical of trans-4,4'-DHS, 4-O-radical of 3,4-trans-DHS, 4-O-radical of trans-3,4,5-THS, 4'-O-radical of trans-3,4,4'-THS, 4-O-radical of 3,4,4'-THS, 4'-O-radical of α,β -dihydro-3,4',5-THS and 4'-O-radical of CR.

Bond and Dihedral angles	C=C	O ₄ -H ₄	O ₃ -H ₃	O ₄ -H ₄	C ₅ C ₄ C ₇ C ₈	C ₇ C ₈ C ₉ C ₁₀	Energy
TR	1.345	–	0.962	0.963	0.02	0.02	–766.571045
CR	1.345	–	0.962	0.963	27.43	39.22	–766.562776
trans-4',4-DHS	1.346	0.962	–	0.962	0.00	0.00	–691.328145
trans-3,4,5-THS	1.345	0.965	0.962	–	6.98	6.47	–766.573012
trans-3,4,4'-THS	1.345	0.963	0.961	0.962	0.29	0.46	–766.571878
trans-3,4-DHS	1.345	0.962	0.960	–	0.00	0.00	–691.328528
α,β -dihydro-3,4',5-THS	–	–	0.960	0.962	–	–	–767.793375
4'-O radical of TR	1.363	–	0.962	–	0.00	0.00	–765.934850
4'-O-radical of 4',4-DHS	1.361	0.961	–	–	0.00	0.00	–690.693727
4-O-radical of 3,4,5-THS	1.362	–	0.961	–	0.00	0.00	–765.948469
4-O-radical of 3,4-DHS	1.362	–	0.962	–	0.00	0.00	–690.707321
4'-O-radical of α,β -dihydro-3,4',5-THS	–	–	0.960	–	–	–	–767.151238
4'-O-radical of 3,4,4'-THS	1.362	0.963	0.980	–	0.00	0.00	–765.937949
4-O-radical of 3,4,4'-THS	1.362	–	0.980	0.963	0.04	0.00	–765.951976
4'-O-radical of CR	1.361	–	0.962	–	15.69	36.55	–765.924442

lack of experimental data for other cis-stereoisomers of trans-analogues of trans-resveratrol, the antioxidant properties of these cis-stereoisomers have been not investigated. It was our intention to employ the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory to perform the most reliable optimization of the geometrical parameters of these compounds and to calculate physical descriptors characterizing their antioxidant ability. In particular, the homolytic bond dissociation enthalpy (BDE) of 4'-O-H and 4-O-H bonds, adiabatic ionization potential (AIP), HOMO orbital distribution and spin density in the 4'-O and 4-O-free radicals were calculated. Moreover, the purpose of this study was to show that trans-4,4'-DHS, trans-3,4-DHS, trans-3,4,4'-THS and trans-3,4,5-THS are more active antioxidants than TR, whereas α,β -dihydro-3,4',5-THS and CR have significantly lower ability to scavenge free radicals than TR. The results were compared with the experimental conclusions reported by Fan [13], Fang, [14] and Stivala et al. [15]. It should be emphasized that we did not have the experimental values of AIP and BDE. Because of no experimental values of BDE and AIP, we could not express the errors in predictions of these calculated antioxidant factors. Note that in the experimental works the antioxidant properties of the compounds studied were estimated on the basis the EQ, EC₅₀ and the kinetic parameters as well as oxidation potential reported by Fang et al. [14]. EC₅₀ is the antioxidant concentration necessary to decrease the initial amount of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) by 50% while EQ is the concentration required for each compound to double the half-life with respect to control reaction. Unfortunately, these purely empirical parameters cannot be calculated with the use of the Gaussian 03W package. Hence, in this study we explain the differences in the antioxidant activity of the compounds studied and confirm the conclusions of the experimental studies.

In contrast to the works by Cao et al. [11] and Quieroz et al. [12], in our study new phenolic antioxidants are examined and detailed analysis of the geometric parameters of these compounds, their 4'-O, 4-O-radicals in gas phase and water medium is performed. We

present a detailed analysis of the geometrical parameters of these chemical systems. Our study carefully explains the influence of these optimized geometries and the presence of the vinyl bond on the antioxidant properties of the compounds studied. Note that the novelty of our study is investigation of the antioxidant activity of two stereoisomers of resveratrol in both environments. Hence, for the first time the stereochemical contribution to this activity of the stereoisomers of resveratrol is considered with the aid of ab initio quantum computations in polar medium. To investigate the influence of solvent on antioxidant properties of the compounds examined, the solvent effect was also included in computations. Therefore, our results contribute to explanation of the antioxidant activity of the compounds studied in living cells in which the environment with the participation of free radicals is polar. On the basis of this fact we conclude that the computations in the gas phase performed by Cao [11] et al. and Quieroz et al. [12] are very useful only for preliminary elucidation of the antioxidant properties of these compounds.

2. Methods

All computations were performed using the GAUSSIAN 03W software package [17]. The images presented in the figures were generated by using ChemSketch and GaussView visualization programs. Full optimization of molecular geometry and energy was carried out in the gas phase and water environment. Full optimizations were made without symmetry constraints. Geometries of the neutral compounds in their ground state were optimized employing the DFT method with restricted Becke's three-parameter hybrid functional and the nonlocal Lee, Yang and Parr gradient-corrected correlation functional B3LYP [18,19] combined with the 6-311G(d,p) functional basis set. However, for the geometry optimization of the

Table 2

The calculated at B3LYP/6-311G(d,p) level of theory total molecular energies [hartree] of the cis-stereoisomers and relative energies [kcal/mol] for the geometric stereoisomers in the gas phase.

Compounds	Energy	Relative energy
CR	–766.562776	5.189
cis-4,4'-DHS	–691.320744	4.644
cis-3,4,5-THS	–766.559248	8.637
cis-3,4,4'-THS	–766.564754	4.470
cis-3,4-DHS	–691.321182	4.609

Table 3

The total molecular energies [hartree] of the 4'-O and 4-O radicals of cis-stereoisomers and relative energies [kcal/mol] of these radicals of the geometric stereoisomers studied in gas phase calculated at unrestricted B3LYP/6-311G(d,p) level of theory.

Radicals	Energy	Relative energy
4'-O-radical of CR	–765.924442	6.531
4'-O-radical of cis-4,4'-DHS	–690.683669	6.311
4-O-radical of cis-3,4,5-THS	–765.939325	5.738
4'-O-radical of cis-3,4,4'-THS	–765.927584	6.504
4-O-radical of cis-3,4-DHS	–690.697201	6.350
4-O-radical of cis-3,4,4'-THS	–765.942150	6.166

Table 4

The calculated at B3LYP/6-311G(d,p) level of theory total molecular energies [hartree] of the cis-stereoisomers and relative energies [kcal/mol] for the geometric stereoisomers in the water environment.

Compounds	Energy	Relative energy
CR	−766.604433	5.743
cis-4,4'-DHS	−691.349062	7.314
cis-3,4,5-THS	−766.594239	6.642
cis-3,4,4'-THS	−766.599655	5.900
cis-3,4-DHS	−691.346727	5.966

free radicals and cation radicals the unrestricted uB3LYP/6-311G(d,p) level of theory was applied. We employed unrestricted B3LYP exchange-correlation functional for the open-shell molecular systems since it provides the most reliable results. The computations performed for the radicals were made for the optimized most stable structure of the neutral molecules, after H atom abstracted from 4'-OH or 4-OH groups. Since the 4'-OH and 4-OH groups are the most effective in scavenging of free radicals [16], the radicals without 4'- and 4-hydrogen were investigated. In the process of optimization of the structure of radicals and cation radicals the spin contamination was monitored. The mean value of the square of the total spin of 0.750 was maintained. In order to determine the starting geometry of the compounds studied and the approximate location of the minimum energy structures, the potential energy surface scans were made. At first step, the potential energy surfaces, at restricted B3LYP/6-31G(d) level were built by changing the dihedral angles α (C₅–C₄–C₇–C₈) and θ (C₇–C₈–C₉–C₁₀) in the compounds studied. The conformational energy maps were obtained through the discrete rotation of these selected angles in 10° increments, ranging from 0° to 180° with constraint on all other geometrical parameters. Afterwards, the most stable structures obtained from the scan were fully optimized without any constraint around each potential minimum. For all optimized structures, we calculated the harmonic vibrational frequencies of the corresponding bonds to determine stationary points on the potential energy surface. Since the relative hydrogen orientation in OH groups is also the most important geometrical parameter, for the most stable geometries obtained from previous full optimizations, the potential energy surfaces describing the relation between these orientations and total energy were built. These surfaces were generated at B3LYP/6-31G(d) level of theory by changing the dihedral angles β (C₆–C₁–O₄–H₄'), γ (C₁₀–C₁₁–O₅–H₅'), ϕ (C₁₄–C₁₃–O₃–H₃) and δ (C₁₁–C₁₂–O₄–H₄) in 60° increments with constraint on all other geometrical parameters. In the calculations we used the angle increment by 60° in order to find out whether in

the most stable conformations the hydrogen atoms from the OH groups are in the plane of the molecule or out of the plane. Finally, the most stable conformations obtained from these scans were fully optimized at 6-311G(d,p) level of theory and vibrational characterized to check for the presence of imaginary frequencies in the minima. The total molecular energies of the compounds studied assumed to have the optimized structures were almost the same. In this way, the most reliable structures of the antioxidants investigated in the global energy minimum were determined, which seem to be the best theoretical result generated by the methods used in the calculations. In order to explain the influence of the resonance stabilization on the antioxidant activity of trans-4,4'-DHS, the resonance forms of its 4'-O-radical were determined. The homolytic BDE values of the O–H bond were calculated as the differences in the enthalpy of the reactants at 298.15 K and 1.00 atm with the use of the following equation: $BDE = H_{\text{radical}} + H_{\text{H}} - H_{\text{molecule}}$ where H_{radical} is the enthalpy of the free radical, H_{H} is the enthalpy of the H-atom (−0.49764 [hartree]) with the vibrational correction [10] whereas H_{molecule} indicates the enthalpy of the parent molecule. The AIP values were obtained according to the formula $AIP = E_{\text{CR}} - E_{\text{P}}$ in which E_{P} is the total energy of the parent molecule whereas E_{CR} denotes the corresponding total energy of the cation radical generated after the electron transfer. In all computations, cation radicals from the optimized neutral compounds in the global energy minimum were generated and further fully optimized. The HOMO orbital distribution and spin density distribution were determined by using the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory for the fully optimized structure of the compounds and their 4'-O and 4-O-radicals. Additionally, the spin density for each atom of the 4'-O and 4-O-radicals studied was computed using the unrestricted B3LYP/6-311G(d,p) level of theory in gas phase and water environment.

Since the free radical-scavenging action strongly depends on polar solution in the real biological systems, solvent effect was taken into account in this study. The solvent effects were computed by using the conductor polarizable solvation model (CPCM) [20] as implemented in the Gaussian 03W program. In this model water is assumed as a macroscopic continuum characterized a dielectric constant $\epsilon = 78.39$. The UAO solvent cavity model was used in the computations. The UAO cavity is built-up using the united atom topological model UATM [21] applied on atomic radii of the universal force field UFF [22]. The CPCM computations were performed with tesserae of 0.2 Å² average size. We investigated the influence of water environment on the stability of O–H bonds, the values of AIP and spin density. The solvent effect in the conformational equilibrium was obtained for the fully optimized most stable trans-stereoisomers, CR, α,β -dihydro-

Table 5

The B3LYP/6-311G(d,p) optimized in the water medium bond lengths [Å], dihedral angles [deg], total energies [hartree] of TR, CR, trans-4,4'-DHS, trans-3,4,5-THS, trans-3,4,4'-THS, trans-3,4-DHS, 4'-O-radical of trans-TR, 4'-O-radical of trans-4,4'-DHS, 4-O-radical of 3,4-trans-DHS, 4-O-radical of trans-3,4,5-THS, 4'-O-radical of trans-3,4,4'-THS, 4-O-radical of 3,4,4'-THS, 4'-O-radical of α,β -dihydro-3,4',5-THS and 4'-O-radical of CR.

Bond and Dihedral angles	C=C	O ₄ –H ₄	O ₃ –H ₃	O ₄ –H ₄ '	C ₅ C ₄ C ₇ C ₈	C ₇ C ₈ C ₉ C ₁₀	Energy
TR	1.347	–	0.982	0.983	0.10	0.00	−766.613485
CR	1.347	–	0.982	0.983	26.51	38.62	−766.604333
trans-4',4-DHS	1.347	0.982	–	0.982	0.01	0.00	−691.360718
trans-3,4,5-THS	1.347	0.977	0.975	–	4.58	4.04	−766.604823
trans-3,4,4'-THS	1.347	0.983	0.976	0.982	0.33	0.46	−766.609058
trans-3,4-DHS	1.347	0.983	0.976	–	0.00	0.00	−691.356234
α,β -dihydro-3,4',5-THS	–	–	0.981	0.982	–	–	−767.832870
4'-O radical of TR	1.368	–	0.983	–	0.11	0.13	−765.975119
4'-O-radical of 4',4-DHS	1.372	0.985	–	–	0.00	0.00	−690.725411
4-O-radical of 3,4,5-THS	1.366	–	0.985	–	0.00	0.00	−765.980779
4-O-radical of 3,4-DHS	1.363	–	0.984	–	0.00	0.00	−690.728335
4'-O-radical of α,β -dihydro-3,4',5-THS	–	–	0.982	–	–	–	−767.187787
4'-O-radical of 3,4,4'-THS	1.369	0.985	0.978	–	0.00	0.00	−765.973781
4-O-radical of 3,4,4'-THS	1.367	–	0.983	0.984	0.04	0.00	−765.983506
4'-O-radical of CR	1.366	–	0.982	–	19.43	36.55	−765.962693

3,4',5-THS, 4'-O, 4-O radicals and cation radicals in the gas phase, at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory.

3. Results and discussion

3.1. The optimized geometries of TR, CR, trans-3,4-DHS, trans-3,4,4'-THS, trans-3,4,5-THS, trans-4,4'-DHS, α,β -dihydro-3,4',5-THS, their free radicals and cation radicals

The O₄–H₄, O₄'–H₄', O₃–H₃ and C=C bond lengths and the torsion angles between two phenyl rings, which are the most significant structural parameters of the equilibrium optimized neutral structure of all the compounds investigated and their 4'-O and 4-O-radicals in

their ground states, are summarized in Table 1. The optimization of all compound structures using 6-311G(d,p) basis set leads to the absolute energy minimum on the potential energy surface, whose presence is confirmed by the lack of imaginary frequencies. The energetic analysis performed reveals that α,β -dihydro-3,4',5-THS is the most stable compound in the mediums studied. Probably it is due to the absence of the vinyl bond. Additionally, the all cis-stereoisomers and their 4-O and 4'-O-radicals are energetically less stable than their trans-stereoisomers in the environment studied (Tables 2–5). This result is confirmed by the values of relative energies calculated as the difference between total energies of the geometric stereoisomers studied (Table 2). The small values of these relative energies reveal the high torsional flexibility of the compounds

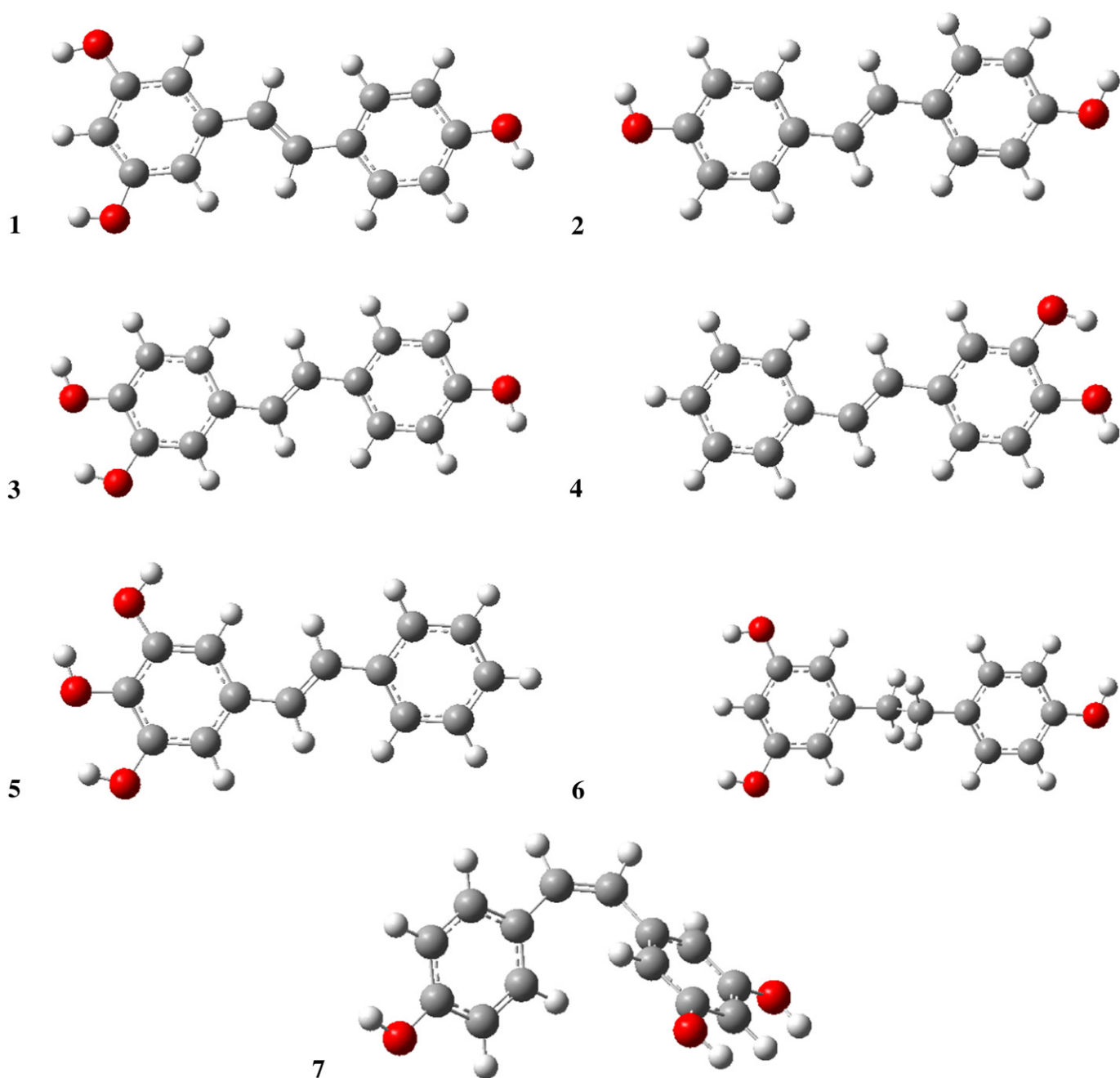


Fig. 2. The B3LYP/6-311G(d,p) optimized geometries of TR (1), trans-4,4'-DHS (2), trans-3,4,4'-THS (3), trans-3,4-DHS (4), trans-3,4,5-THS (5), α,β -dihydro-3,4',5-THS (6) and CR (7) in the gas phase.

studied. The significant value of the relative energy for the 3,4,5-THS stereoisomers in the gas phase can be related to the high energy of cis-stereoisomer whose geometry is strongly deviated from planarity (α ($C_5-C_4-C_7-C_8$) = 38.89° , θ ($C_7-C_8-C_9-C_{10}$) = 31.14°). Note that the energy differences between the lowest energy conformations of trans and cis-stereoisomers (except for stereoisomers of 3,4,5-THS) are lower than that of their 4'-O and 4-O radicals. The calculated C=C bond lengths of the central moiety of the molecules studied have similar values in the gas phase. However, in the radical forms the C=C bonds are longer than those in the neutral molecules. We observe that all O₃-H₃ bond lengths in the compounds studied are slightly shorter than the O₄-H₄ and O₄'-H₄' bonds. The optimized values of the β ($C_6-C_1-O_4-H_4$), γ ($C_{10}-C_{11}-O_5-H_5$), φ ($C_{14}-C_{13}-O_3-H_3$) and δ ($C_{11}-C_{12}-O_4-H_4$) dihedral angles

indicate that hydrogen atoms from OH groups lie in the surface of the all compounds, their radical forms and cation radicals in both environments. According to the calculation results, these dihedral angles are approximately 0° and 180° in the mediums studied. On the basis of the optimized values of the α ($C_5-C_4-C_7-C_8$) and θ ($C_7-C_8-C_9-C_{10}$) dihedral angles, it is evident that the geometries of the trans-stereoisomers studied (Fig. 2) and their radicals (Fig. 3) as well as cation radicals (Fig. 4) are strictly planar in the gas phase. In comparison with the gas phase, the water environment causes an increase in the lengths of the C=C bonds and a significant increase in the O-H bond lengths in all compounds and their 4'-O-radicals (Table 5). This finding shows that water environment evidently facilitates the heterolytic dissociation of the hydroxyl bonds. Also, in water environment all trans-stilbene derivatives studied (except for

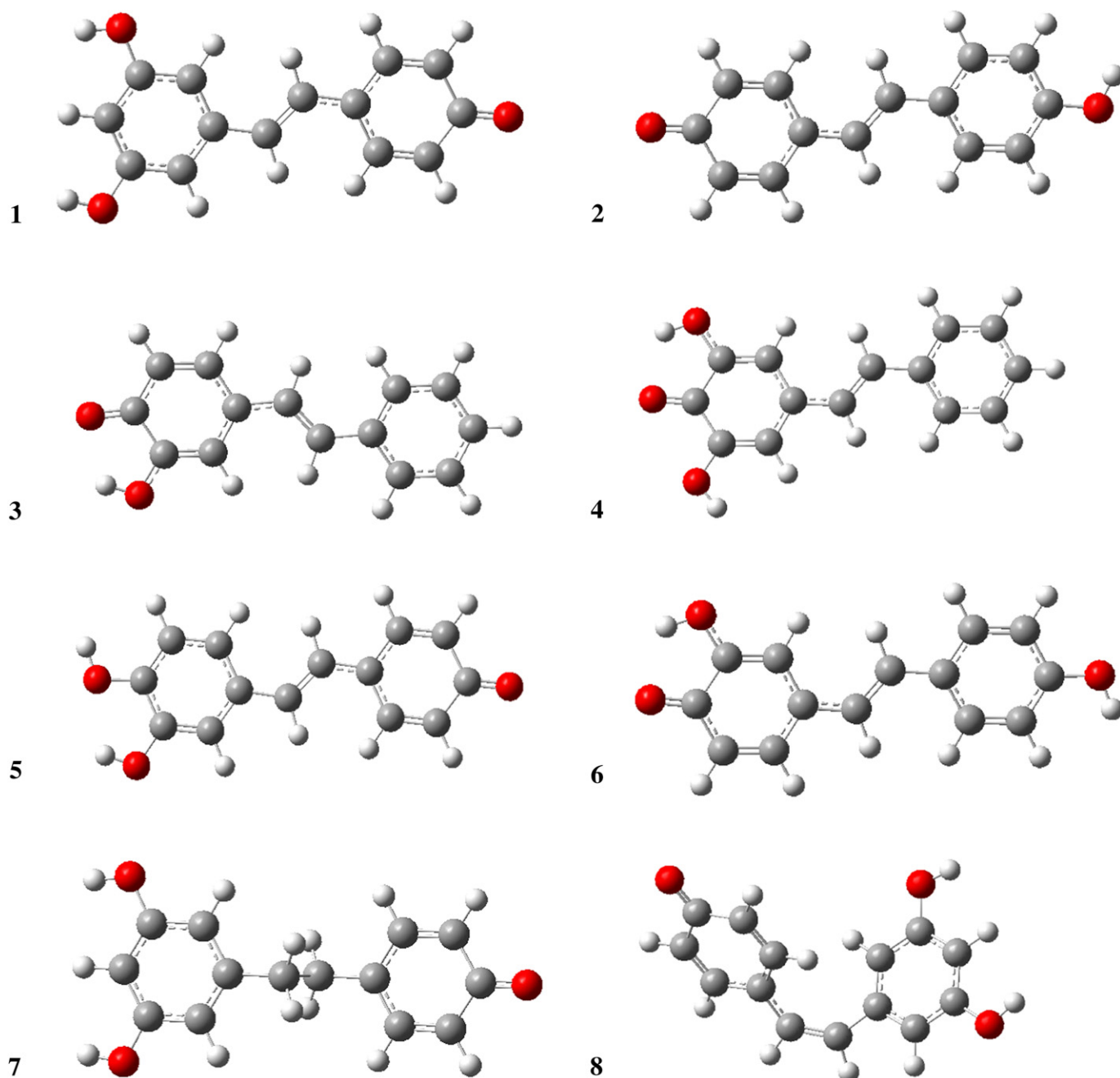


Fig. 3. The uB3LYP/6-311G(d,p) optimized geometries of the 4'-O-radical of TR (1), 4'-O-radical of trans-4,4'-DHS (2), 4-O-radical of trans-3,4-DHS (3), 4-O-radical of trans-3,4,4,5-THS (4), 4'-O-radical of trans-3,4,4'-THS (5), 4-O-radical of trans-3,4,4'-THS (6), 4'-O-radical of α,β -dihydro-3,4',5-THS (7) and 4'-O-radical of CR (8) in the gas phase.

trans-3,4,5-THS), their 4'-O, 4-O-radicals and cation radicals have planar equilibrated geometries. Besides, the all chemical systems studied in water environment are more energetically stable than in the gas phase (Table 5). The slight deviation from the planarity found for trans-3,4,5-THS in both environments is probably due to the unfavourable location of hydroxyl groups. In our opinion the strong interaction between closely localized hydroxyl groups is the main contribution to this distortion of the planar geometry. It is interesting to note that also CR (Fig. 9), its 4'-O-radical and cation radical have geometry significantly deviating from the planarity in the environments studied. The values of the α (C₅–C₄–C₇–C₈) and θ (C₇–C₈–C₉–C₁₀) dihedral angles in CR and its 4'-O-radical explicitly confirm this finding (Table 1). Thus, this deviation can be the main reason for the higher energy of CR than TR in the environments studied. It is well

known that the molecular structure of TR and other antioxidant can contribute to the electron transfer during scavenging of free radicals [15]. The stacking interactions between the planar investigated molecules can permit energetically favourable hydrogen atom transfer in the interaction and facilitate the interaction with free radicals. The energetic analysis reveals that all 4'-O, 4-O-radicals are less stable than the neutral molecules in the examined mediums, therefore they can be more reactive in the biochemical reactions. The optimized structures of the 4'-O and 4-O radicals are planar and have semiquinone form; the unpaired electron is localized in these forms mainly on the O atom in the para position leading to the stabilization of the radicals. Also, the high delocalization of the unpaired electron on the vinyl bond is strongly emphasized. Note that the presence of the vinyl bond and the electron donation hydroxyl groups in these

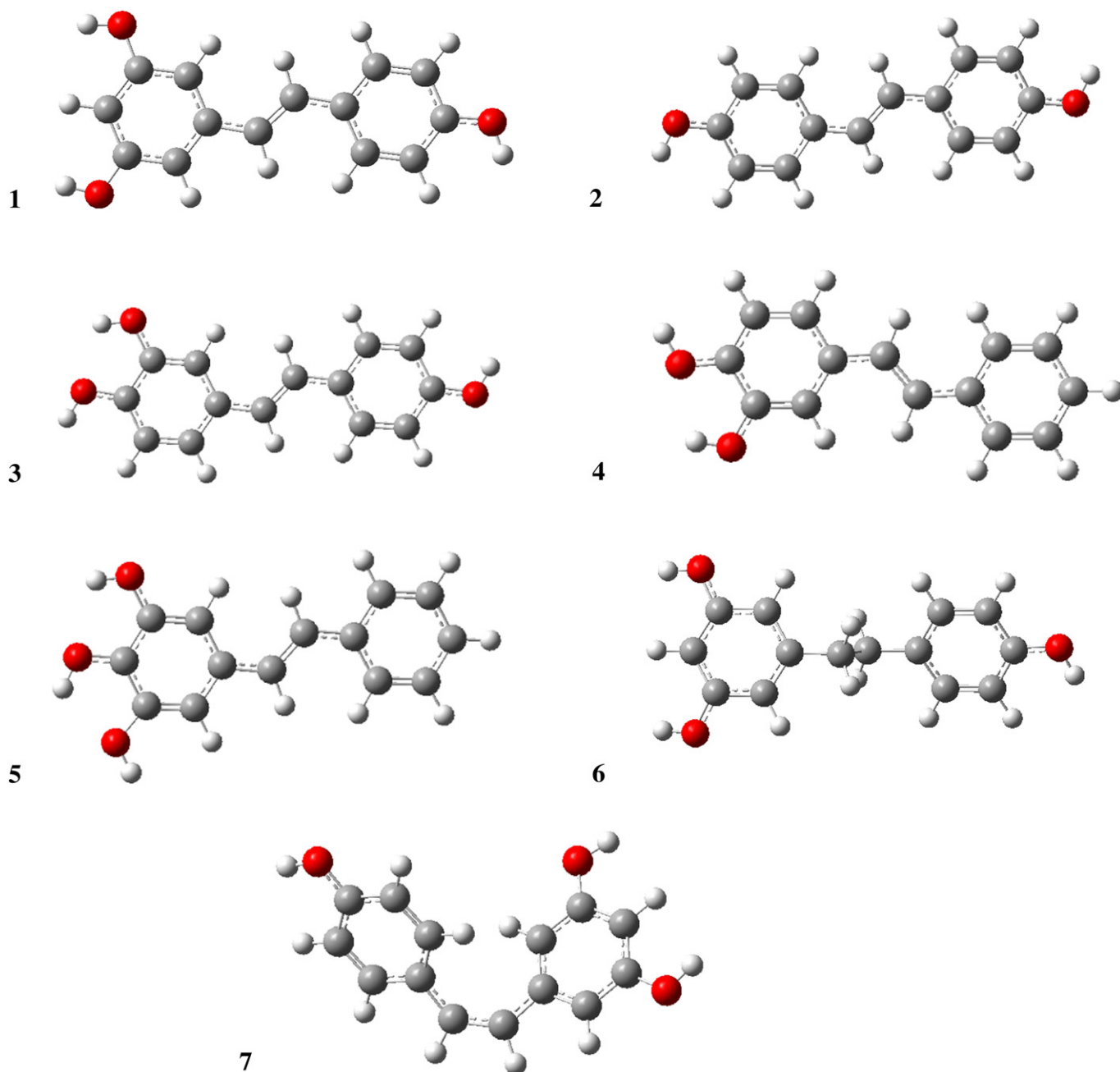


Fig. 4. The uB3LYP/6-311G(d,p) optimized geometries of the cation radicals of TR (1), trans-4,4'-DHS (2), trans-3,4,4'-THS (3), trans-3,4-DHS (4), trans-3,4,5-THS (5), α,β -dihydro-3,4',5-THS (6) and CR (7) in the gas phase.

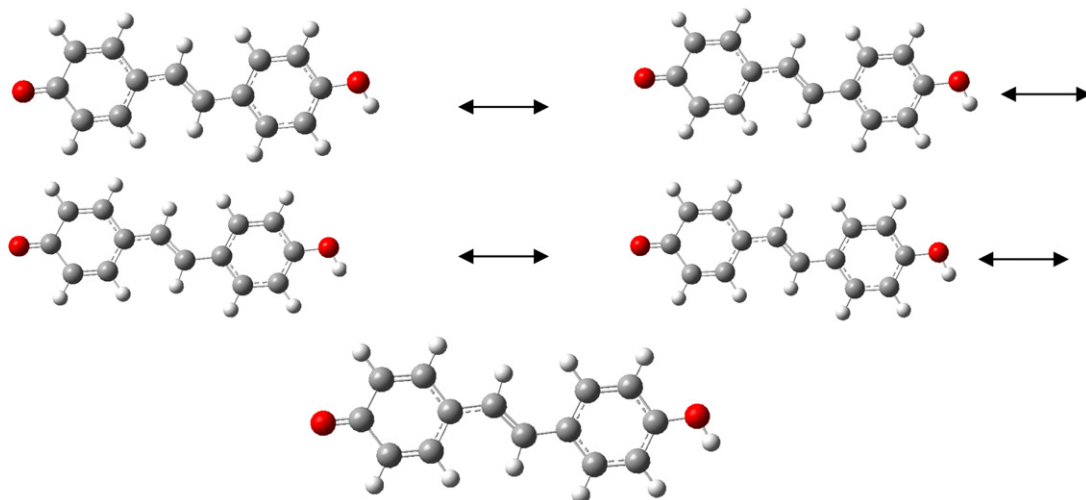


Fig. 5. The uB3LYP/6-311G(d,p) optimized geometries of the resonance forms of trans-4,4'-DHS in the gas phase.

radicals may also stabilize their semiquinone geometry. The corresponding resonance forms of the 4'-O-radicals of trans-4,4'-DHS (Fig. 5) are almost isoenergetic ($E = -690.69372721$ [hartree]), thus, they are characterized by similar stability and are strongly stabilized by the resonance. All geometric parameters in these forms take the comparable values and the unpaired electron is distributed mainly on the vinyl bond in their planar conformation.

3.2. BDE, AIP, HOMO orbital distribution and spin density distribution. The influence of water environment

The hydrogen donating ability of the wide class of polyphenols and the ability of these compounds to form the radical forms are characterized by BDE, whereas AIP is an important physical factor indicating the range of electron donation. The BDE corresponds to the O–H bond breaking (H abstraction), thus this parameter describes the stability of the hydroxyl bonds. The molecules with lower values of BDE and AIP are endowed with higher antioxidant activity. The calculated values of the BDE and AIP for the molecules studied in the gas phase are present in Table 6. The results indicate that AIP and BDE for trans-4,4'-DHS, trans-3,4-DHS, trans-3,4,4'-THS and trans-3,4,5-THS are lower than those for TR while the smallest value of AIP of trans-3,4,4'-THS. It proves that these compounds are more efficient free radical scavengers than TR and that these molecules seem to donate the single-electron during the interaction with free radicals. In particular, trans-3,4,4'-THS is mainly susceptible to electron transfer. Analyzing the values of BDE of the 4-O–H bond for all compounds one can find that for trans-3,4,4'-THS and trans-3,4-DHS this antioxidant factor takes the smallest value in the gas phase. In our opinion, this result for trans-3,4-DHS can be interpreted as a consequence of the presence of all hydroxyl groups in one phenyl ring. In such an arrangement the hydroxyl groups at 3 and 5 positions reduce the stability of the 4'-O–H and 4-O–H bonds by intermolecular hydrogen interaction. This result confirms the results reported by Fang et al. [14]. Additionally, 3,4,4'-trans-THS has a higher value of BDE of 4'-O–H bond than 4-O–H. Hence, in this molecule 4-O–H bond is more sensitive to interaction with free radicals. Similarly, the high antioxidant potency of trans-4,4'-DHS is related to the favourable location of phenolic hydroxyl groups. The presence of two strong donation hydroxyl groups in para positions contributes to the ease of the electron donation. It is well known that electron-donating groups increase the stability of polyphenolic free radicals and decrease the

stability of parent molecules. Thus, we conclude that the decrease in BDE for all polyphenols can arise from the number of the strong electron-donating hydroxyl groups and their favourable location in the para positions of the studied molecules. Moreover, the conjunction of the phenyl rings by double bond ensures the most energetically favourable resonance stabilization, which facilitates the high electron transfer after the hydrogen abstraction in para or ortho positions. In contrast to the previous results, BDE of 4'-OH group and the AIP for α,β -dihydro-3,4',5-THS are significantly higher than for TR and other antioxidants studied. This result shows that the double bond between the phenyl rings is a very important structural element which determines the antioxidant potency of the phenolic compounds.

The BDE and AIP values of CR are higher than those of its trans-stereoisomer in both types of environment. It proves that cis-stereoisomer is less efficient antioxidant than trans-resveratrol. This result confirms the experimental observation by Stivala et al. [15]. It should be pointed out that planar conformation of free radical and cation radical ensures favourable spin and unpaired electron distribution, which is an important parameter determining the stability of the radicals and antioxidant power. Therefore, the deviation from planarity of CR, its 4'-O-radical and cation radical is the main factor determining the decrease in the reduction of the antioxidant activity of CR. We can conclude that the non-planar geometry of the 4'-O-radical of CR can effectively prevent the delocalization of the unpaired electron in this radical.

Table 6

The B3LYP/6-311G(d,p) in the gas phase calculated values of the AIP [kcal/mol] and BDE [kcal/mol] of 4'-O–H bond of TR, 4'-O–H bond of trans-4,4'-DHS, 4-O–H bond of trans-3,4,5-THS, 4-O–H bond of trans-3,4,4'-THS, 4'-O–H bond of trans-3,4,4'-THS, 4-O–H bond of trans-3,4-DHS, 4'-O–H bond of α,β -dihydro-3,4',5-THS and 4'-O–H bond of CR.

Antioxidant	BDE	AIP
TR	78.683	157.061
trans-4,4'-DHS	77.663	152.212
trans-3,4,5-THS	71.816	151.342
trans-3,4,4'-THS (4-OH)	68.986	150.227
trans-3,4,4'-THS (4'-OH)	77.845	150.227
trans-3,4-DHS	69.734	156.691
α,β -dihydro-3,4',5-THS	82.401	168.183
CR	80.026	159.349

When the solvent effect was taken into account, a significant influence of water medium on AIP values was observed (Table 8). The values of this antioxidant factor in water medium are dramatically lower than in gas phase. It is well known that cation radicals are charged and quite sensitive to the polarity of various solvents. As expected in water environment the lower values of AIP than in gas phase were obtained. From this result it is evident that this polar medium can facilitate electron donation which is one of the most important process of free radical scavenging. Moreover, the values of AIP indicate that trans-3,4,4'-THS is the most efficient the electron donor from among the compounds studied and that the all trans-stereoisomers studied are more sensitive to electron donation than TR, while α,β -dihydro-3,4',5-THS is less sensitive to the electron donation than TR.

Comparing the values of BDE (Tables 6, 8) in the environments studied, we observe that in water medium these values are higher than in gas phase. Hence, on the basis of the values of BDE in water environment it can be concluded that this medium decreases the ability of the hydroxyl groups to homolytic dissociation. This finding reveals that in water the antioxidants studied have a lower ability to hydrogen transfer than in gas phase. Similarly as in the gas phase the computations performed in water environment reveal that trans-3,4,4'-THS has highest the hydrogen atom donating ability whereas the ability of α,β -dihydro-3,4',5-THS to this process is smallest. In comparison with TR, the all trans-stilbene derivatives in water medium are expected to show higher hydrogen atom donating activity since the corresponding BDE values are lower

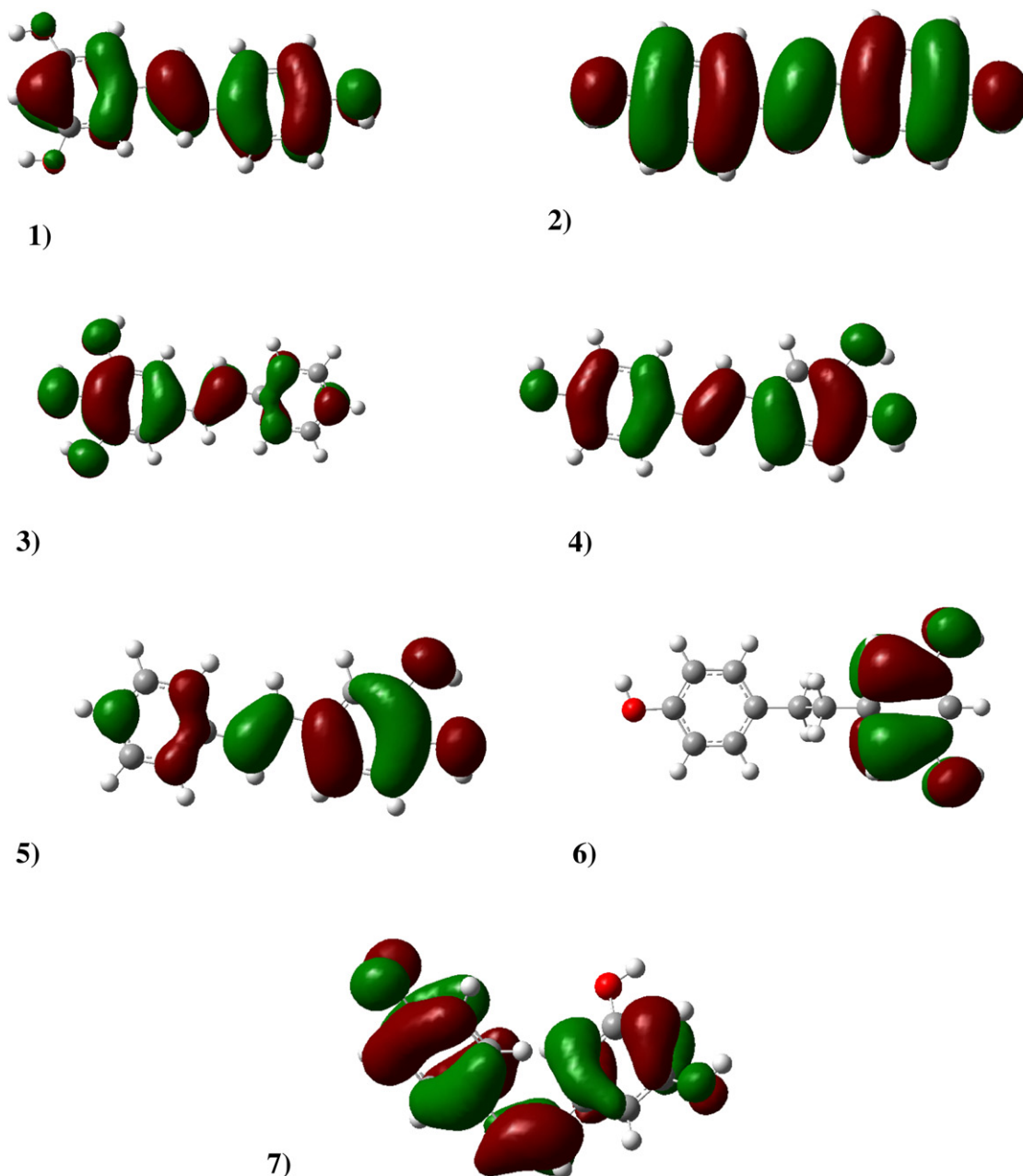


Fig. 6. The HOMO orbital distribution in TR (1), trans-4,4'-DHS (2), trans-3,4,5-THS (3), trans-3,4,4'-THS (4), trans-3,4-DHS (5), α,β -dihydro-3,4',5-THS (6) and CR (7) in the gas phase.

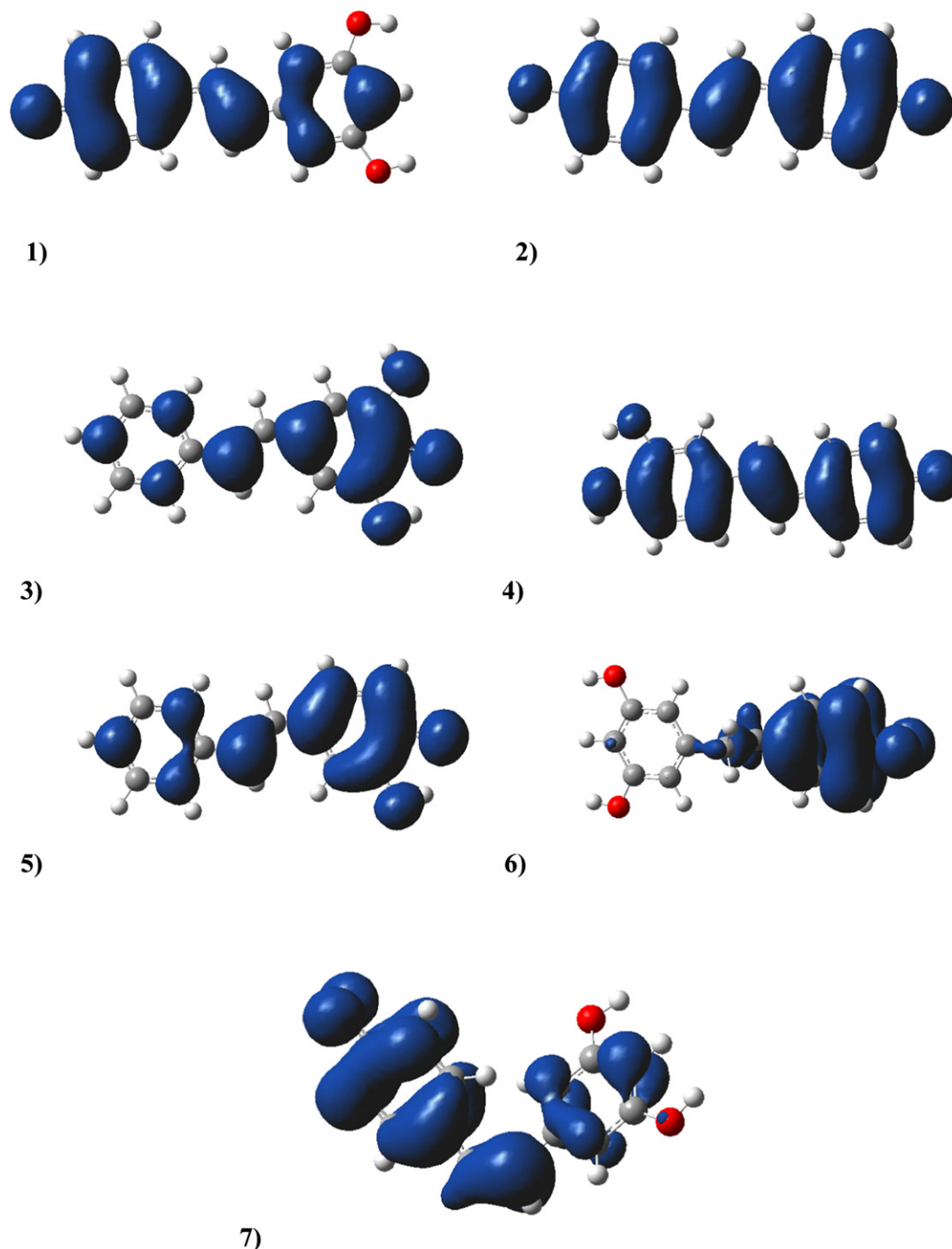


Fig. 7. The spin density distribution in 4'-O-radical of TR (1), 4'-O-radical of trans-4,4'-DHS (2), 4-O-radical of trans-3,4,5-THS (3), 4'-O-radical trans-3,4,4'-THS (4), 4-O-radical of trans-3,4-DHS (5), 4'-O-radical of α,β -dihydro-3,4',5-THS (6) and 4'-O-radical of CR (7) in the gas phase.

that those obtained for TR. This result is in agreement with the calculations performed in the gas phase. The findings obtained lead to the conclusion that the trans-stereoisomers studied are stronger antioxidants than TR in the mediums considered. However, the calculated smaller values of BDE than AIP prove that the H-atom transfer mechanism for scavenging of free radicals is most favourable in the mediums studied. Hence, in physiological conditions, a scavenging of harmful free radicals by the antioxidants investigated may be achieved mainly *via* hydrogen donation.

Another important molecular parameter correlated with the free radical scavenging activity is the energy of the HOMO orbital. The molecules with a lower energy of the HOMO orbital have weaker electron donating ability. Besides, the electronic density distribution in these orbitals permits prediction of the most probable sites in the molecules investigated which can be easily attacked by free radicals and other reactive agents. More active redox sites of these molecules are characterized by high density of the HOMO orbital. Analysis of the distribution of HOMO orbital (Fig. 6) shows that for all trans-stereoisomers and CR it is delocalized on the whole

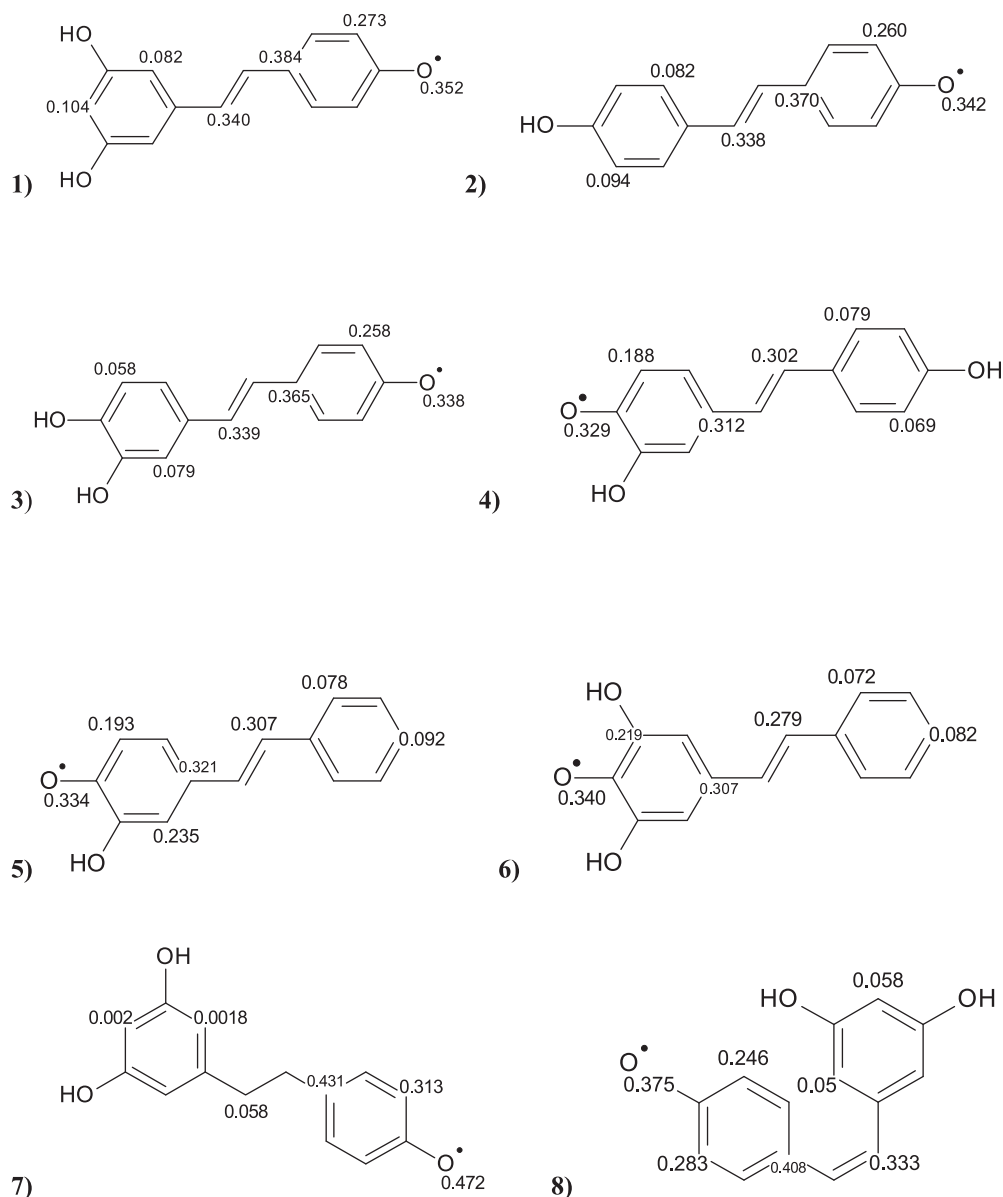


Fig. 8. The computed at uB3LYP/6-311G(d,p) level of theory spin density in the 4'-O-radical of TR (1), 4'-O-radical of trans-4,4'-DHS (2), 4'-O-radical of trans-3,4,4'-THS (3), 4-O-radical trans-3,4,4'-THS (4), 4-O-radical of trans-3,4-DHS (5), 4-O-radical of trans-3,4,5'-THS (6), 4'-O-radical of α,β -dihydro-3,4',5'-THS (7) and 4'-O-radical of CR (8) in the gas phase.

molecule and particularly on the 4- and 4'-positions and double bond which connects the phenyl rings. Hence, the 4'-OH and 4-OH groups in both compounds can be easily attacked by the free radicals in the real biological systems. The high range of delocalization of this orbital indicates that the compounds investigated have many active redox sites. In contrast, the OH groups in meta position are

insensitive to the interactions with free radicals. This observation for TR is in an excellent agreement with the results obtained by Cao et al. [11]. Furthermore, in all trans-stilbene derivatives studied the HOMO orbital is distributed along both phenyl rings. This finding is strongly correlated with the presence of the vinyl bond, which facilitates the HOMO orbital distribution between two phenyl rings.

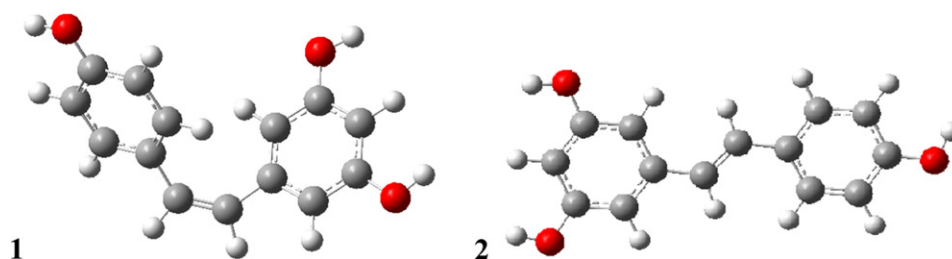


Fig. 9. The B3LYP/6-311G(d,p) fully optimized geometries of CR (1) and TR (2) in the water medium.

Table 7

The uB3LYP/6-311G(d,p) spin density calculated on the 4'-O and 4-O atoms in the 4'-O and 4-O-radicals of the compounds studied in the water environment.

Radical	Spin density
4'-O-radical of TR	0.315
4'-O-radical of trans-4,4'-DHS	0.314
4-O-radical of trans-3,4,5-THS	0.312
4-O-radical of trans-3,4,4'-THS	0.303
4'-O-radical of trans-3,4,4'-THS	0.311
4-O-radical of trans-3,4-DHS	0.309
4'-O-radical of α,β -dihydro-3,4',5-THS	0.443
4'-O-radical of CR	0.334

Comparing the HOMO orbital distribution in CR and TR we observe that CR shows significant reduction of the density of the HOMO orbital at 3-OH and 5-OH group. However, α,β -dihydro-3,4',5-THS is characterized by total reduction of the HOMO orbital distribution at a-phenyl ring.

One of the most important parameters which can be used to characterize the antioxidant activity is also the spin density distribution in free radicals. The stability of free radicals and the antioxidant potency are mainly determined by this factor. The calculations performed reveal that in all compounds which are derivatives of trans-stilbene, the spin density is delocalized through the whole molecules but comes mainly from the oxygen atoms in para position and the vinyl bond. Moreover, Fig. 7 shows that the spin density is distributed over the whole molecules with high concentrations on the phenyl rings and vinyl bond. These results can be related to better stabilization of 4'-O and 4-O free radicals and support the results obtained for the HOMO orbital distribution. The high localization of the spin density on the hydroxyl bonds in para and ortho positions prove that TR, trans-4,4'-DHS, trans-3,4-DHS, trans-3,4,4'-THS and trans-3,4,5-THS are excellent antioxidants. High differences in the distribution of the spin density in α,β -dihydro-3,4',5-THS were obtained. In the 4'-O-radical of this compound, the contribution of spin density from the all atoms of b-phenyl ring and C=C bond linking the phenyl rings has decreased. In our opinion it is mainly related to the lower ability of this radical to the resonance stabilization caused by the absence of the vinyl bond. Comparing the spin distribution in 4'-O-radical of CR and TR we find that 4'-O-radical of CR is characterized by significant reduction of the spin density at 3- and 5- position. However, this distribution is mainly concentrated around the atoms in the a-phenyl ring. This reduction observed is probably a result of the steric hindrance in the cis-4'-O radical of CR.

The computed spin density in 4'-O and 4-O radicals studied in gas phase (Fig. 8) indicates that the main contribution to this density comes from the oxygen at 4'- and 4-position. The contribution from this oxygen in (2), (3), (4), (5) and (6) radicals presented in the Fig. 8 is smaller than from those in TR. The smallest values of the spin density

Table 8

The B3LYP/6-311G(d,p) in the water medium calculated values of the AIP [kcal/mol] and BDE [kcal/mol] of 4'-O-H bond of TR, 4'-O-H bond of trans-4,4'-DHS, 4-O-H bond of trans-3,4,5-THS, 4-O-H bond of trans-3,4,4'-THS, 4'-O-H bond of trans-3,4,4'-THS, 4-O-H bond of trans-3,4-DHS, 4'-O-H bond of α,β -dihydro-3,4',5-THS and 4'-O-H bond of CR.

Antioxidant	BDE	AIP
TR	80.728	118.940
trans-4,4'-DHS	79.103	113.380
trans-3,4,5-THS	73.914	116.339
trans-3,4,4'-THS (4-OH)	70.075	112.398
trans-3,4,4'-THS (4'-OH)	79.977	112.398
trans-3,4-DHS	71.338	117.414
α,β -dihydro-3,4',5-THS	85.545	129.106
CR	82.731	120.837

Table 9

The experimental values of the oxidation potential E [14] and EQ [15] for the anti-oxidants studied.

Antioxidant	E [V]	EQ [μ M]
TR	0.62	135 \pm 8.81
trans-4,4'-DHS	0.40	–
trans-3,4,5-THS	0.24	–
trans-3,4,4'-THS	0.32	–
trans-3,4-DHS	0.34	–
α,β -dihydro-3,4',5-THS	–	260 \pm 11.2
CR	–	241 \pm 38.0

on 4' and 4-oxygen in 4'-O and 4-O-radical of trans-3,4,4'-THS indicate that this compound is most effective antioxidant from among the compounds studied. This finding is in accordance with the results of the computations of BDE and AIP. In the global spin density calculated for 4'-O-radicals of TR, trans-4,4'-DHS, trans-3,4,4'-THS, CR and α,β -dihydro-3,4',5-THS the main contribution comes from a-ring, whereas in that calculated for 4-O-radicals of trans-3,4-DHS, trans-3,4,5-THS and trans-3,4,4'-THS the main contribution comes from b-ring. It should be emphasized that 4'-O-radical of α,β -dihydro-3,4',5-THS shows a significant increase in the contribution of the spin density from 4'-O atom and atoms from the a-phenyl ring while very small values of spin density from b-phenyl rings including oxygen's at meta positions were obtained. The absence of vinyl bond in this radical decreases the spin density in b-phenyl ring. It is interesting to note that in cis-4'-O-radical of CR and all trans-4'-O-radicals the spin density takes large values on the carbon of vinyl bond and phenyl ring including 4'- or 4-oxygen. This result confirms the generated spin distribution (Fig. 7) and proves that 4'-OH and 4-OH groups are especially susceptible to free radicals attack. However the high contribution to global spin density from vinyl bond leads to the conclusion that this fragment of radicals can be also sensitive to attack of reactive radical forms. We also observe that the value of the spin density on the 4'-O atom is higher for CR than for TR. Hence, the antioxidant power of CR is lower than that the trans-stereoisomer. In our opinion, this result is related to the distorted geometry of CR. The calculated values of the spin density on the 4'-O and 4-O atoms of the corresponding radicals in aqueous medium are lower than in the gas phase (Table 7). Therefore, in water environment the 4'-OH and 4-OH groups in the all compounds can be more sensitive to the interaction with free radicals. From this fact we can conclude that in water environment the compounds studied show higher antioxidant activity than in the gas phase. Moreover, the lower values of the spin density in water medium are related to strong stabilization of the radicals studied by this medium. The computed values of the spin density confirm that all TR trans-derivatives are better antioxidants than TR in aqueous medium while α,β -dihydro-3,4',5-THS and CR have weaker antioxidant potency than TR.

4. Conclusions

The results of DFT computations indicate that trans-4,4'-DHS, trans-3,4-DHS, trans-3,4,4'-THS, trans-3,4,5-THS are more active antioxidants than TR, whereas α,β -dihydro-3,4',5-THS and CR are less able to scavenge free radicals than TR in the environments considered. It has been proved that the most favorable mechanism for radical scavenging is through hydrogen atom donation from the antioxidants studied and their activity can be related to the planar and semiquinone structure of the phenoxy free radicals stabilized by the resonance and the presence of the vinyl bond. The calculations demonstrate that the antioxidant potency strongly depends on the geometry of the neutral compounds and their phenoxy radicals, the number and position of the hydroxyl groups. Since

solvent effect is important for investigation of biological processes in living organisms, the influence of the water medium on an antioxidant activity should be taken into calculations. The findings obtained contribute to the understanding of the pharmacological activity of the compounds studied which thus can be exploited in the food chemistry, medicine and pharmacy.

Acknowledgements

This study is supported by the PCSS in Poznań grant No. 60 “The investigations of the biophysical and chemical properties of trans-resveratrol”. We are indebted to Professor Jerzy Konarski for many helpful and stimulating discussions and to Maria Spychalska for linguistic assistance.

References

- [1] M.F. Wang, J.G. Li, M. Rangarajan, Y. Shao, E.J. Lavoie, T.C. Huang, C.T. Ho, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 4869.
- [2] O. Brede, S. Stajanovic, H. Sprinz, Free Radic. Res. 36 (2002) 76.
- [3] P. Brito, L.M. Almeida, T.C. Dinis, Free Radic. Res. 36 (2002) 176.
- [4] D. Pietraforte, L. Turco, E. Azzini, M. Minetti, Biochim. Biophys. Acta 1583 (2002) 176.
- [5] B. Tadolini, C. Juliano, L. Piu, F. Franconi, L. Cabrini, Free Radic. Res. 33 (2000) 105.
- [6] L.M. Szewczuk, L. Forti, L.A. Stivala, T.M. Penning, J. Biol. Chem. 279 (2000) 22727.
- [7] L. Belguendoz, L. Fremont, A. Linard, Biochem. Pharm. 33 (1997) 1347.
- [8] L. Fremont, L. Belguendouz, S. Delpal, Life Sci. 64 (1999) 2511.
- [9] M. Murias, N. Handler, T. Erker, K. Pleban, G. Ecker, P. Saiko, T. Szekeres, W. Jäger, Bioorg. Med. Chem. 12 (2004) 5571.
- [10] J.S. Wright, R.J. Erin, G.A. DiLabio, J. Am. Chem. Soc. 123 (6) (2001) 1173.
- [11] H. Cao, X. Pan, C. Li, C. Zhou, F. Deng, T. Li, Bioorg. Med. Chem. Lett. 13 (2003) 1869.
- [12] A.N. Queiroz, B.A.Q. Gomes, W.M. Moraes, R.S. Borges, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1644.
- [13] J. G-Fan, X.-D. Liu, Y.-P. Qian, Y.-J. Shang, X.-Z. Li, F. Dai, X.-L. Jin, J.-G. Fang, B. Zhou, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 2360.
- [14] G. J-Fang, M. Lu, Z.-H. Chen, H.-H. Zhu, Y. Li, L.-M. Li YangWu, Z.-Li. Liu, Chem. Eur. J. 8 (2002) 4191.
- [15] L.A. Stivala, M. Savio, F. Carafoli, P. Perucca, L. Bianchi, G. Maga, L. Forti, U.M. Pagnoni, A. Albini, E. Prosperi, V. Vannini, Biolog. Chem. 276 (2001) 222586.
- [16] A. Matsuoka, K. Takeshita, A. Furuta, M. Ozaki, K. Fukuhara, N. Miyata, Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 521 (2002) 29.
- [17] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Menucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian 03. Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, 2003.
- [18] A.D. Becke, J. Chem. Phys. 98 (1993) 5648.
- [19] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Phys. Rev. B 37 (1988) 785.
- [20] A. Klamt, G. Schürmann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 2 (1993) 799.
- [21] A. Ben-Naim, Y. Marcus, J. Chem. Phys. 81 (1984) 2016.
- [22] A.D. Becke, Phys. Rev. A 38 (1988) 3098.



Original article

Quantitative structure–antioxidant activity relationship of *trans*-resveratrol oligomers, *trans*-4,4'-dihydroxystilbene dimer, *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide, glucosides: *Trans*-piceid, *cis*-piceid, *trans*-astringin and *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside

Damian Mikulski*, Marcin Molski

Department of Theoretical Chemistry, Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2009

Received in revised form

31 January 2010

Accepted 7 February 2010

Available online 12 February 2010

Keywords:

DFT method

Oligomers

Trans-resveratrol

Red wine

QSAR

Antioxidant activity

Glucosides

Glucuronide acid

ABSTRACT

By means of the accurate computations based on the density functional theory, the relationships between the molecular structure and free radical scavenging activity have been studied for dimer of *trans*-4,4'-dihydroxystilbene, *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide, glucosides: geometric stereoisomers of piceid, *trans*-astringin, *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside and *trans*-resveratrol dimers: pal-lidol, geometric stereoisomers of ϵ -viniferin, stereoisomers of *trans*- δ -viniferin and *trans*-resveratrol trimer-gnetin H. Our results have shown that all oligomers, glucosides and *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide exhibit stronger antioxidant activity than *trans*-resveratrol and that dimer of *trans*-4,4'-dihydroxystilbene is a stronger antioxidant than its monomer as well as that *cis* stereoisomers of piceid and ϵ -viniferin are weaker antioxidant than their *trans* stereoisomers. The homolytic bond dissociation enthalpy values calculated reveal the predominant H-transfer capacity of the OH groups in the *trans*-stilbene moiety. The hydrogen atom transfer mechanism of free radicals scavenging by the compounds studied is proved more preferable than the single-electron transfer mechanism in the mediums investigated. All the above-mentioned compounds have been proved to have significantly higher ability to electron donation in water medium than in the gas phase. The experimental observations are satisfactorily explained by the results obtained.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Polyphenols play an important role in protection of living cells since they show a variety of biological activities including anti-inflammatory and chemopreventive. Recently, interesting insights into the antioxidant properties and other pharmacological behaviour of *trans*-resveratrol oligomers and glucosides has been reported.

Recently, it has been shown that many paeony compounds occurring in seeds of *Paeonia lactiflora*, *Paeonia suffruticosa* and *Paeonia moutan* show high bioactivity, in particular, carcinogenic protection [1], anti-inflammatory [2], antitumour [3] and antioxidant activity [2]. The study by Das et al. [1] has proved that polyphenolic extracts from red wine play a crucial role in cardioprotection. In particular, these authors have demonstrated that this cardioprotective action is associated with effective

reduction of myocardial ischemic reperfusion injury. The antioxidant properties of *trans*- ϵ -viniferin, gnetin H and other antioxidants isolated from plant *P. lactiflora* have been confirmed by Kim et al. [4]. They have shown that these compounds efficiently inhibit the lipid peroxidation by free radicals and that gnetin H as well as *trans*- ϵ -viniferin are most active antioxidants. On the basis of the values of the antioxidant indicator-IC₅₀ for 2-deoxyribose degradation caused by hydroxyl radicals one can conclude that gnetin H, *trans*- ϵ -viniferin and *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside are more efficient antioxidants than *trans*-resveratrol, whereas *cis*- ϵ -viniferin is characterized by smaller ability to scavenge free radicals than *trans*-resveratrol.

Antioxidant activity of *trans*- ϵ -viniferin and other dimers of *trans*-resveratrol has been reported by Privat et al. [5]. They compared the antioxidative capacity of these compounds to those of *trans*-resveratrol and other synthetic hydroxylated stilbenic derivatives. Their results clearly indicate that *trans*- ϵ -viniferin as dimer of *trans*-resveratrol shows the best antioxidant efficiency against the superoxide radical anions in DMSO used as a solvent.

* Corresponding author. Tel.: +48 607608785; fax: +488291505.

E-mail address: dmkwant@amu.edu.pl (D. Mikulski).

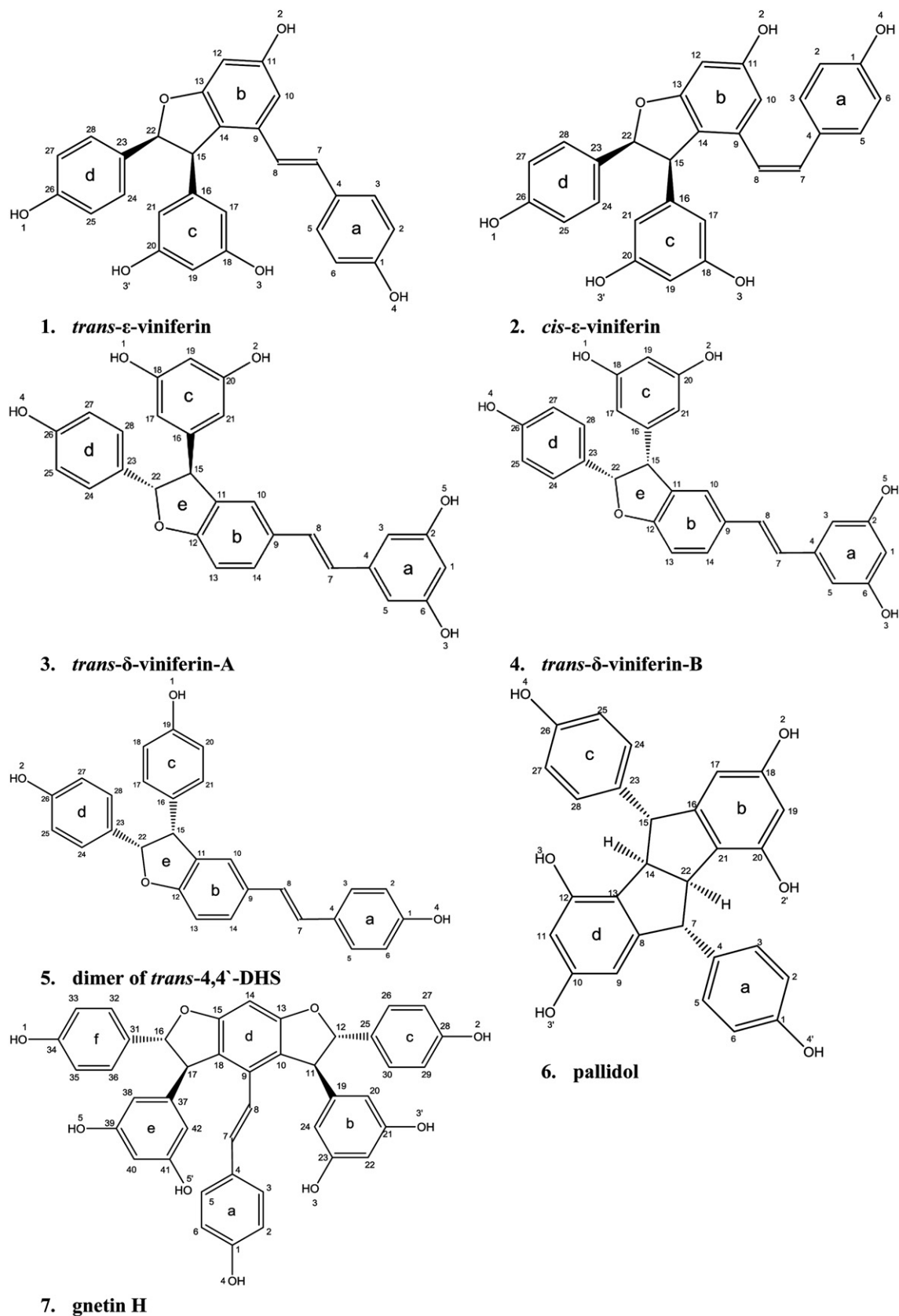


Fig. 1. Molecular structures of *trans*- ϵ -viniferin (1), *cis*- ϵ -viniferin (2), *trans*- δ -viniferin-A (3), *trans*- δ -viniferin-B (4), dimer of *trans*-4,4'-DHS (5), pallidol (6) and gnetin H (7).

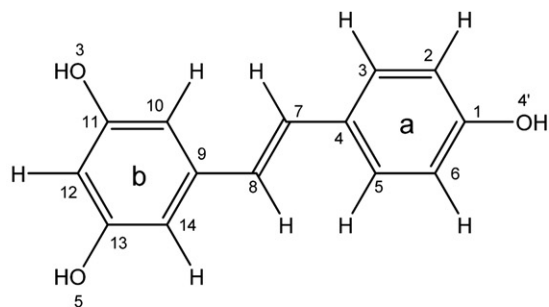
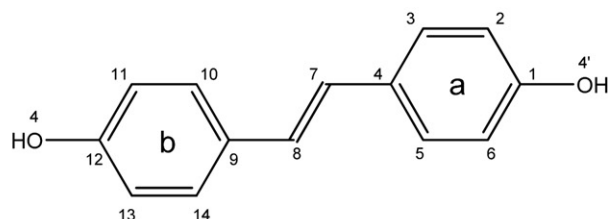
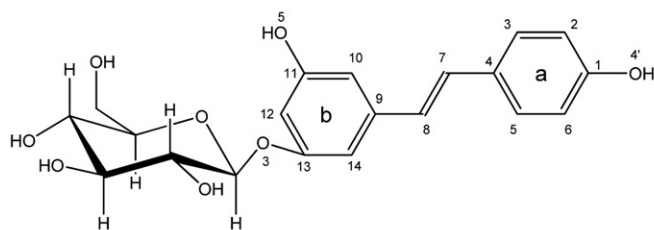
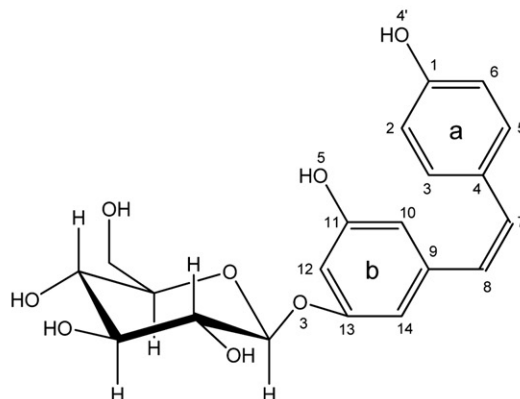
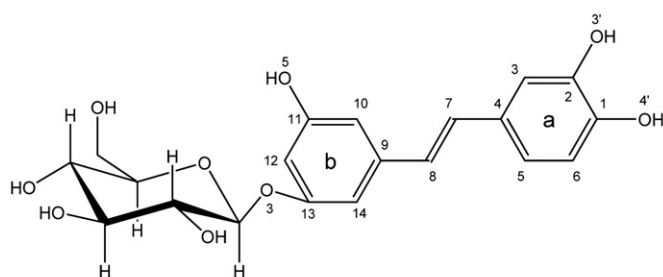
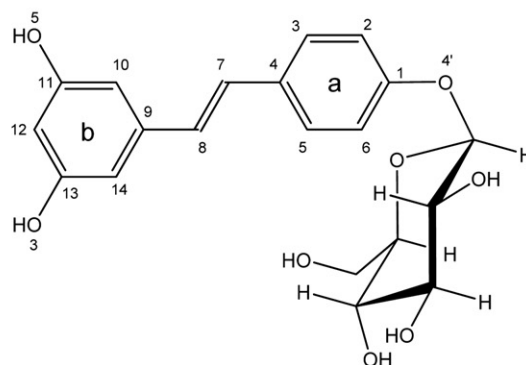
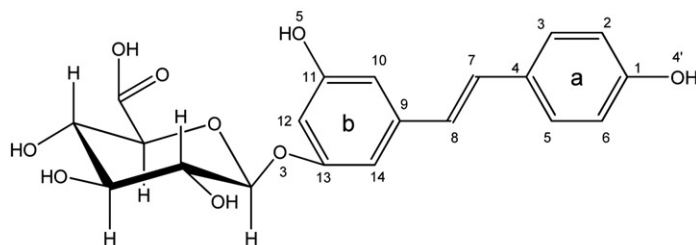
**1. *trans*-resveratrol****2. *trans*-4,4'-DHS****3. *trans*-piceid****4. *cis*-piceid****5. *trans*-astringin****6. *trans*-resveratrol-4'-O-β-D-glucopyranoside****7. *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide**

Fig. 2. Molecular structures of *trans*-resveratrol (1), *trans*-4,4'-DHS (2), *trans*-piceid (3), *cis*-piceid (4) *trans*-astringin (5), *trans*-resveratrol-4'-O-β-D-glucopyranoside (6) and *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide (7).

The dimer of *trans*-resveratrol has been identified by Wang et al. [6] as a product of dimerization of *trans*-resveratrol free radicals. The dimeric structure of this compound has been confirmed by ^1H and ^{13}C NMR data. Formation of this dimer also has been suggested by Fukuhara et al. [7] who claim that it could be generated by

dimerization of *trans*-resveratrol radical as a result of reductive activation of oxygen.

Recently, Fan et al. [8] identified the dimer of *trans*-4,4'-dihydroxystilbene (dimer of *trans*-4,4'-DHS) as a product of oxidative dimerization of phenoxy radical in the presence of

Table 1

B3LYP/6-311G(d,p) optimized values of hydroxyl bond lengths [Å] of dimer of *trans*-4,4'-DHS, pallidol, stereoisomers of ϵ -viniferin, *trans*- δ -viniferin-A and B, gnetin H, *trans*-resveratrol, *trans*-4,4'-DHS, *trans*-piceid, *cis*-piceid, *trans*-astringin, *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide and *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside in the gas phase.

Compounds	4-O-H	4'-O-H	2-O-H	2'-O-H	3-O-H	3'-O-H	1-O-H	5-O-H
<i>Trans</i> -resveratrol ^a	–	0.9628	–	–	0.9622	–	–	0.9622
<i>Trans</i> -4,4'-DHS ^a	0.9627	0.9627	–	–	–	–	–	–
Dimer of <i>trans</i> -4,4'-DHS	0.9627	–	0.9626	–	–	–	0.9626	–
<i>Trans</i> - ϵ -viniferin	0.9627	–	0.9624	–	–	0.9624	0.9626	–
<i>Cis</i> - ϵ -viniferin	0.9627	–	0.9624	–	–	0.9624	0.9626	–
<i>Trans</i> - δ -viniferin-A	0.9627	–	0.9625	–	0.9623	–	–	0.9622
<i>Trans</i> - δ -viniferin-B	0.9627	–	0.9624	–	0.9628	–	–	0.9627
Gnetin H	0.9628	–	–	–	0.9625	–	0.9627	–
Pallidol	0.9625	0.9625	–	0.9622	–	0.9620	–	–
<i>Trans</i> -piceid	–	0.9627	–	–	–	–	–	0.9637
<i>Cis</i> -piceid	–	0.9626	–	–	–	–	–	0.9633
<i>Trans</i> -astringin	–	0.9618	–	–	–	0.9656	–	0.9632
3-O-glucuronide	0.9628	–	–	–	–	–	–	0.9629
<i>Trans</i> -resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside	–	–	–	–	0.9625	–	–	0.9625

^a From Ref. [31].

Cu(II) ions. The authors synthesized a new strong antioxidant-*trans*-4,4'-dihydroxystilbene (*trans*-4,4'-DHS) and investigated its antioxidant activity by the inhibitory effects against peroxidation of human erythrocyte ghosts. In this study the dimer mentioned was shown to form in the presence of copper ions (II) in acetonitrile.

Vitrac et al. [9] isolated *trans*- ϵ -viniferin-dimer of *trans*-resveratrol, *trans*- δ -viniferin, *trans*-piceid and *trans*-astringin from Brazilian wines using high-performance liquid chromatography method coupled with UV detection. Their study demonstrated that *trans*- δ -viniferin, *cis*-resveratrol, *trans*-piceid and *trans*-astringin (Fig. 2) occur in these wines in high concentrations. However, Waffo-Teguo et al. [10] demonstrated that *cis*-piceid occurs in the plant *Vitis vinifera*.

He et al. [11] using the EPR technique, studied the antioxidant activity of dimer of *trans*-resveratrol–pallidol naturally occurring in plant *Cissus pallida* on the reactive oxygen species. Their results based on the kinetic study showed that this compound was highly capable of scavenging singlet oxygen at very low concentrations. The antioxidant potency of pallidol was also evaluated by Kim et al. [12]. Their study clearly indicated that this compound was a stronger antioxidant than *trans*-resveratrol. The phenolic compounds in red wine were identified by Guebailia et al. [13]. In this study the three-step method was applied to isolate the six polyphenolic antioxidants including pallidol, *trans*-piceid in red wine of Merlot variety from Algeria.

The metabolism of *trans*-resveratrol *in vitro* and *in vivo* has been investigated by Yu et al. [14]. This study demonstrated that *trans*-resveratrol in rat urine and mouse serum was biotransformed into *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide and *trans*-resveratrol-3-O-sulfate which are most abundant metabolites of this *trans*-resveratrol in living cells.

Theoretical study of the antioxidant properties of dimeric derivative of *trans*-resveratrol–*trans*- σ -viniferin in the gas phase has been performed by Caruso et al. [15] by making use of DFT method and Perdew and Wang (PWC) functional [16] with a double numeric basis set with polarization functions (DNP) [17] on all atoms. The authors have investigated five phenolate anions of this compound in the gas phase and claimed that the most stable anion was that obtained after abstraction of proton from the 4-OH group in the *para* position in the planar moiety.

Recently, much attention has been given bioactivity of *trans*-resveratrol glucoside–*trans*-piceid (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene-3-O- β -D-glucopyranoside, Fig. 2). It has been reported that this compound is able to scavenge free radicals, inhibit platelet aggregation [18] and oxidize LDL [19]. Note that *trans*-piceid similarly to *trans*-resveratrol is a grapevine phytoalexin

which occurs in high concentrations in the grape juices, while the concentration of *cis*-piceid is smaller than that of *trans* stereoisomer [20]. Fabris et al. [21] reported important recognition of the antioxidative features of *trans*-piceid. They proved that antioxidant activities of *trans*-piceid and *trans*-resveratrol were similar. The ability of *trans*-piceid and *trans*-astringin (*trans*-3',5,4',3-tetrahydroxystilbene-3-O- β -D-glucopyranoside) to act as radical scavengers was also investigated by Fauconneau et al. [22]. Their data demonstrated that *trans*-astringin was a very effective antioxidant whose antioxidant capacity was significantly higher than those of *trans*-piceid and *trans*-resveratrol.

As the above-mentioned compounds have been reported to possess the great pharmacological potential including radical scavenging activity, the experimental results motivated us to investigate theoretically the antioxidant activity of these compounds and to perform the 3-D-QSAR analysis with the use of the computations based on the density functional theory. The crucial aim of the study undertake was to calculate the physical descriptors characterizing the antioxidant efficiency of pallidol, gnetin H, *trans*-4,4'-DHS, geometric stereoisomers of piceid, geometric stereoisomers of ϵ -viniferin, stereoisomers of *trans*- δ -viniferin, *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside, dimer of *trans*-4,4'-dihydroxystilbene, *trans*-astringin and *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide in order to compare the antioxidant potency of these compounds with that of *trans*-resveratrol (Figs. 1 and 2). Moreover, we have investigated the antioxidant potency of geometric stereoisomers of ϵ -viniferin and piceid in order to explain the influence of configuration of the stilbene moiety on this potency. It should be emphasized that we had no access to the experimental values of AIP (adiabatic ionization potential), BDE

Table 2

The B3LYP/6-311G(d,p) optimized values of the dihedral angles α [°] and θ [°] in the antioxidants studied. All values are referred to the gas phase.

Compounds	α	θ
<i>Trans</i> -resveratrol	0.02	0.02
<i>Trans</i> -4,4'-DHS	0.00	0.00
Dimer of <i>trans</i> -4,4'-DHS	5.69	5.95
<i>Trans</i> - ϵ -viniferin	5.22	14.03
<i>Cis</i> - ϵ -viniferin	26.93	44.80
<i>Trans</i> - δ -viniferin-A	1.58	2.44
<i>Trans</i> - δ -viniferin-B	0.22	1.47
Gnetin H	0.10	14.08
Pallidol	–	–
<i>Trans</i> -piceid	0.01	1.99
<i>Cis</i> -piceid	31.17	41.84
<i>Trans</i> -astringin	1.34	1.55
3-O-glucuronide	2.71	0.75
<i>Trans</i> -resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside	1.60	2.70

(homolytic bond dissociation enthalpy) and geometrical parameters of the oligomers and glucosides studied. Hence, we could not compare the calculated antioxidant factors with experimental data. However, on the basis of the calculated values of these antioxidant factors we could reliably elucidate the experimental conclusions. Since water is the main component of all the physiological liquids, the influence of water medium on the ability of the compounds examined to donor electrons was also investigated.

2. Computational methods

All computations were carried out by using the Gaussian 03W package [23] in the gas phase and water environment. Full optimizations of geometries of all chemical systems studied were made without symmetry constraints and with the use of Cartesian coordinates. Geometries and total molecular energies of all chemical systems studied in their ground state were optimized

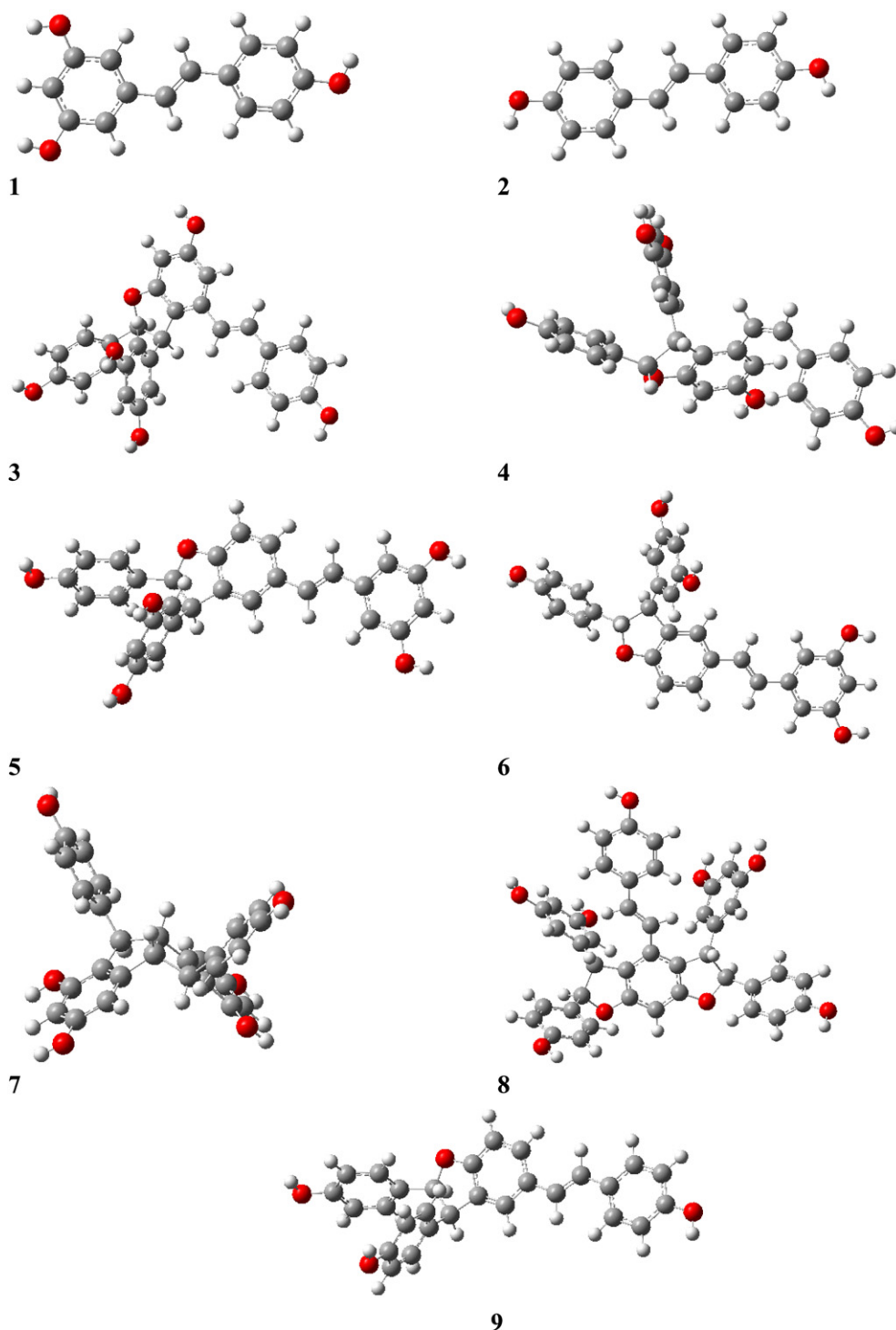


Fig. 3. B3LYP/6-311(d,p) fully optimized geometries of *trans*-resveratrol (1), *trans*-4,4'-DHS (2), *trans*- ϵ -viniferin (3), *cis*- ϵ -viniferin (4), *trans*- δ -viniferin-A (5), *trans*- δ -viniferin-B (6), pallidol (7), gnetin H (8) and dimer of *trans*-4,4'-DHS (9).

employing the DFT method with Becke's three-parameter hybrid functional B3LYP with the gradient-corrected correlation functional by Lee et al. [24]. The optimizations of all oligomers, their radicals, cation radicals and resonance forms were performed in two steps. The geometries of neutral oligomers in their ground state were at first optimized by using restricted B3LYP/3-21G level of theory. At the next step, the initially optimized geometries were fully reoptimized with the aid of large and more reliable 6-311G(d,p) basis set which has two sets of polarization functions on all atoms. The full optimization of the geometry of glucosides and *trans*-resveratrol-3-

O-glucuronide was performed with the use of the restricted B3LYP/6-311G(d,p) level of theory. Since the phenoxy radicals and cation radicals are open-shell systems, the unrestricted uB3LYP/6-311G(d,p) level of theory for their full optimization was applied. The calculations for the phenoxy radicals, resonance forms of radicals and cation radicals were performed from the fully optimized structure of the neutral molecule, after H-atom abstraction from the hydroxyl groups and after electron abstraction. In optimization of the molecular structure of radicals and cation radicals, the spin contamination was monitored. The mean value of the

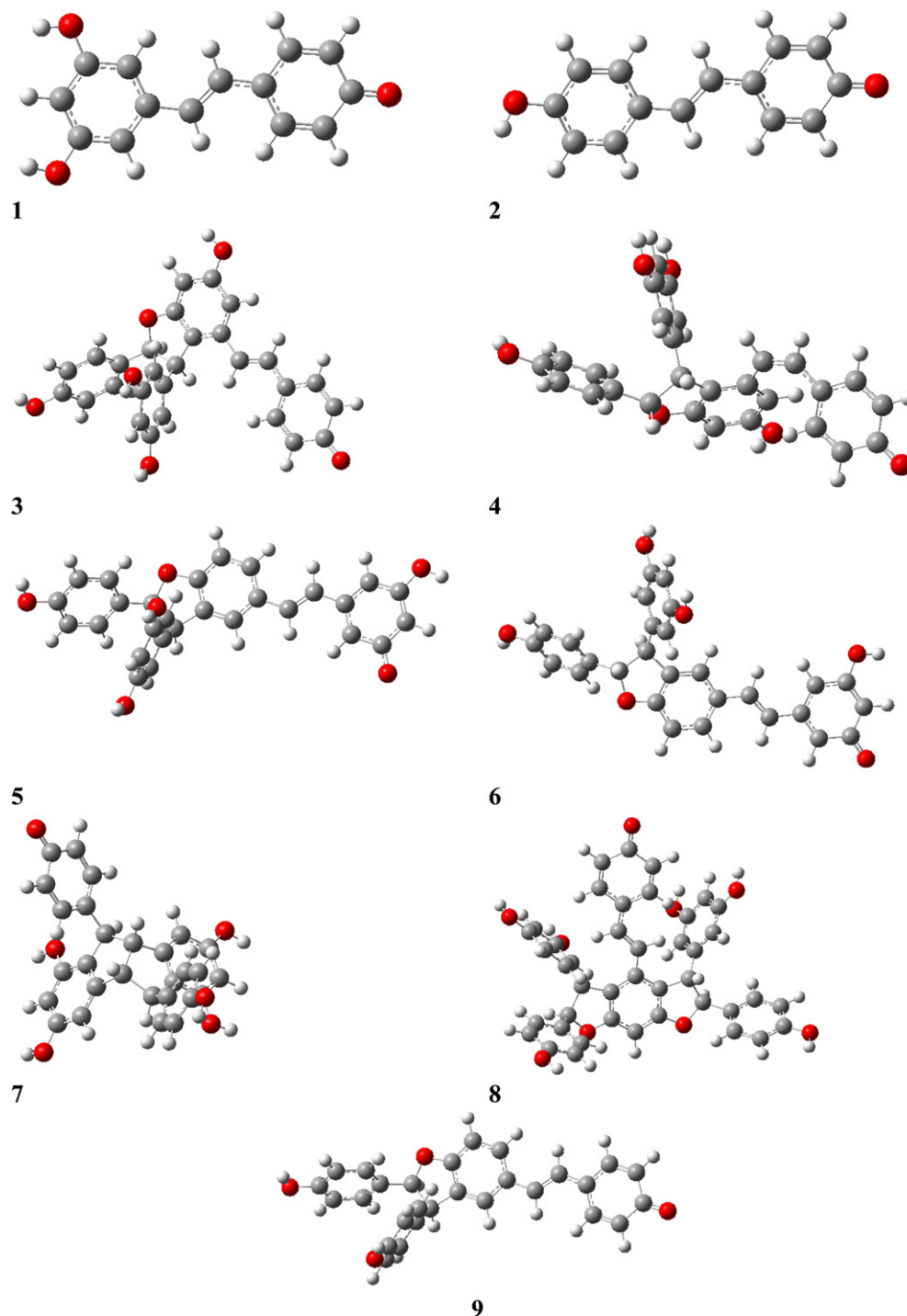


Fig. 4. B3LYP/6-311(d,p) fully optimized geometries of phenoxy radicals of *trans*-resveratrol (1), *trans*-4,4'-DHS (2), *trans*- ϵ -viniferin (3), *cis*- ϵ -viniferin (4), *trans*- δ -viniferin-A (5), *trans*- δ -viniferin-B (6), pallidol (7), gnetin H (8) and dimer of *trans*-4,4'-DHS (9).

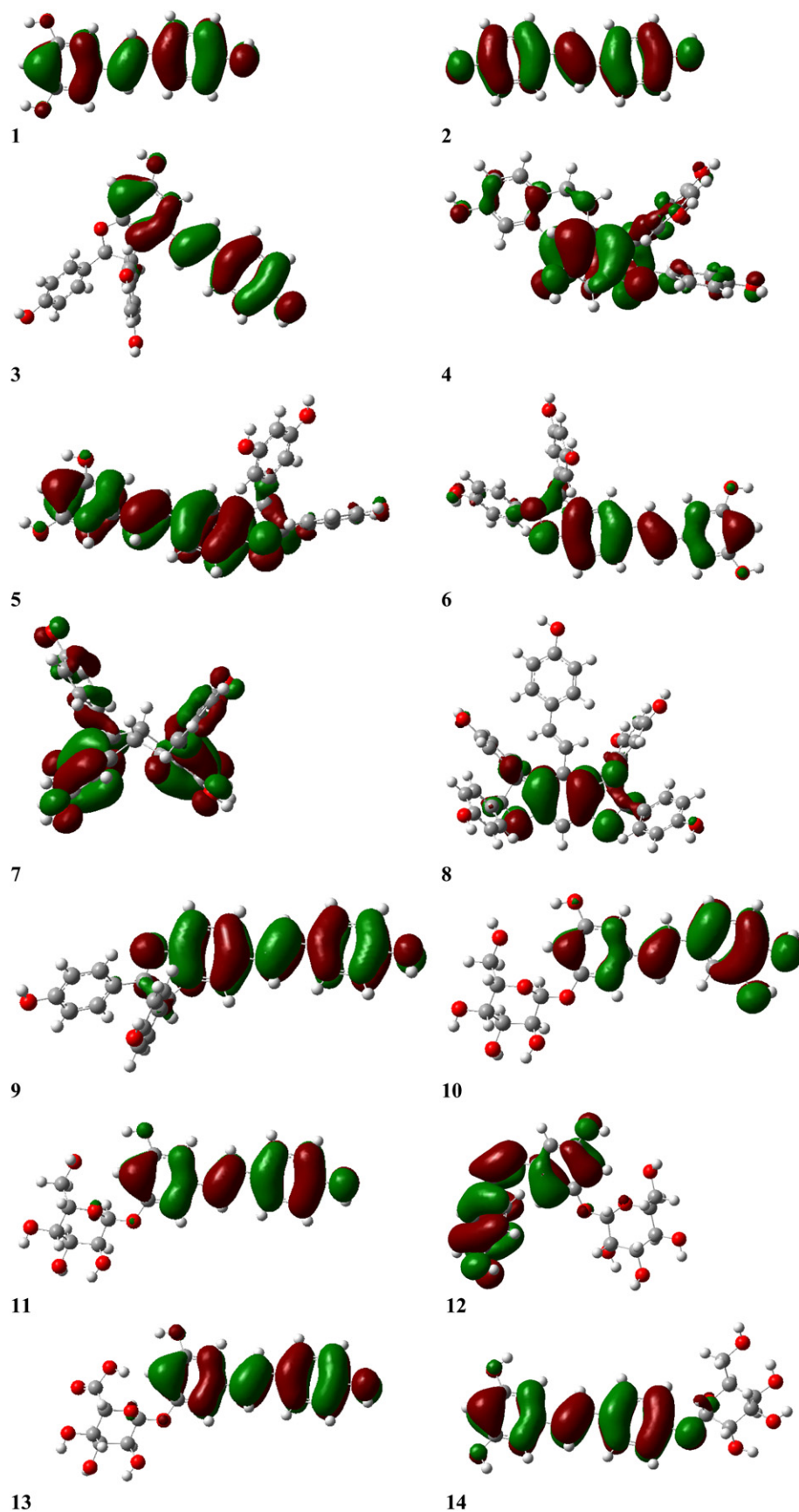


Fig. 5. The HOMO orbital distribution in *trans*-resveratrol (1), *trans*-4,4'-DHS (2), *trans*- ϵ -viniferin (3), *cis*- ϵ -viniferin (4), *trans*- δ -viniferin-A (5), *trans*- δ -viniferin-B (6), pallidol (7), gnetin H (8), dimer of *trans*-4,4'-DHS (9), *trans*-astringin (10), *trans*-piceid (11), *cis*-piceid (12), *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide (13) and *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside (14).

square of the total spin of 0.750 was maintained. Finally for each fully optimized structure, the analytical calculations of harmonic vibrational frequencies at B3LYP/6-311G(d,p) level of theory were carried out to verify if a given the structure corresponded to a stationary point on the potential energy surface. These frequencies for all optimized structures were calculated checking that the eigenvalues of the Hessian matrix are positive, that is, the conformers are true energetic minima. Besides, we performed the frequency calculations to extract zero-point energy corrections and enthalpies. The zero-point vibrational energies (ZPVE) were scaled by a factor of 0.9805 [25].

The homolytic BDE values of the O–H bonds were calculated as the enthalpy differences of the reagents in the standard state at

298.15 K and 1 atmosphere of pressure. This antioxidant quantity was calculated from the following equation: $BDE = H_{\text{radical}} + H_{\text{H}} - H_{\text{molecule}}$ where H_{radical} is the total enthalpy of the phenoxy free radical, H_{H} is the total enthalpy of the H-atom (−0.49764 hartree) with the vibrational correction [10] whereas H_{molecule} indicates the total enthalpy of the parent molecule. The AIP values were obtained according to the formula $AIP = E_{\text{CR}} - E_{\text{P}}$ in which E_{P} is the total energy of the parent molecule, whereas E_{CR} denotes the corresponding total energy of the cation radicals. The HOMO orbital distribution for the optimized most energetically stable geometries was determined, whereas the spin density oxygen atoms were computed by using the unrestricted B3LYP/6-311G(d,p) level of theory for the fully optimized structures of the

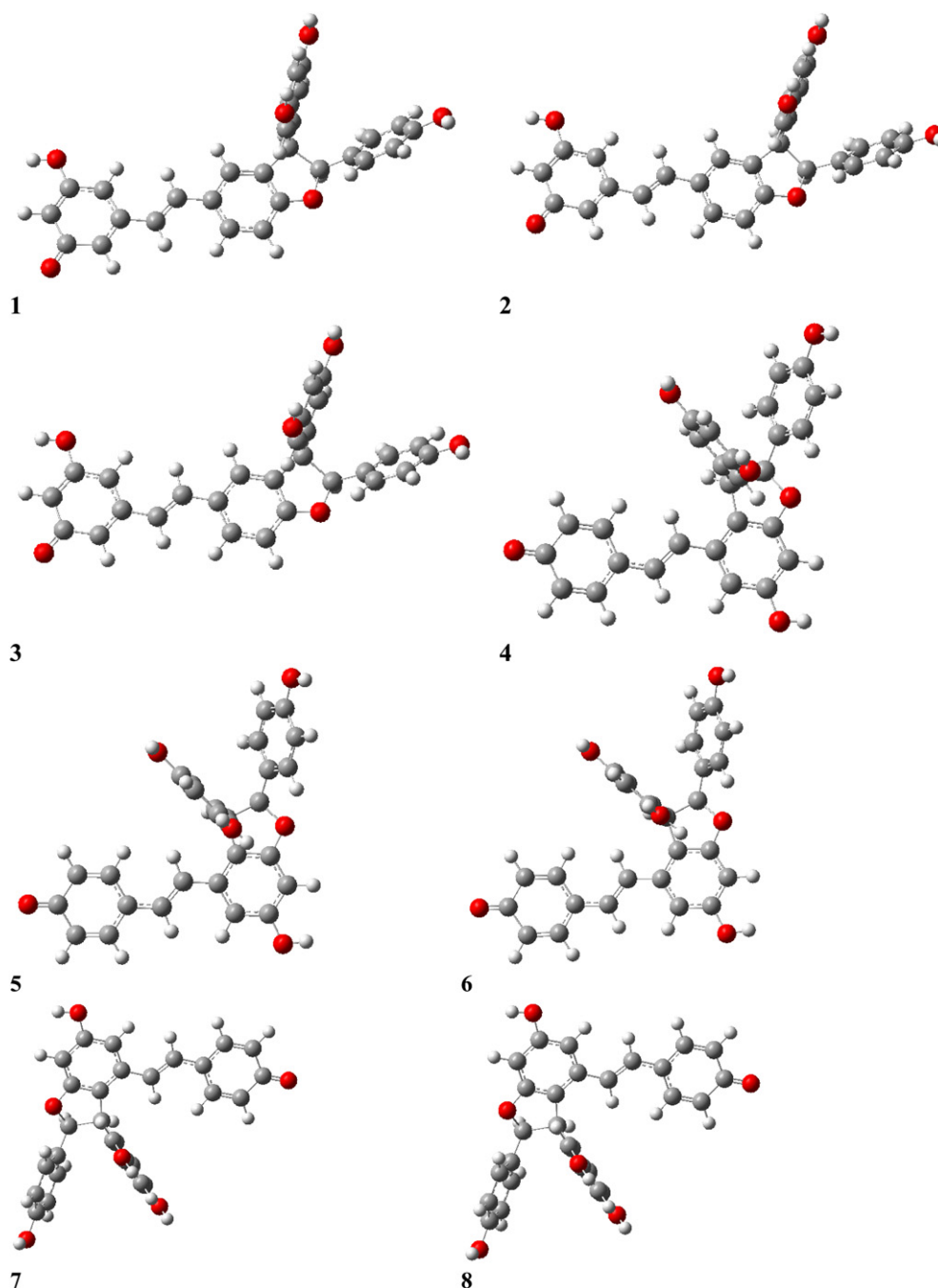


Fig. 6. The uB3LYP/6-311G(d,p) fully optimized structures of the resonance forms of 3-O-radical of *trans*- δ -viniferin-A (1, 2, 3) and 4-O-radical of *trans*- ϵ -viniferin (4, 5, 6, 7, 8).

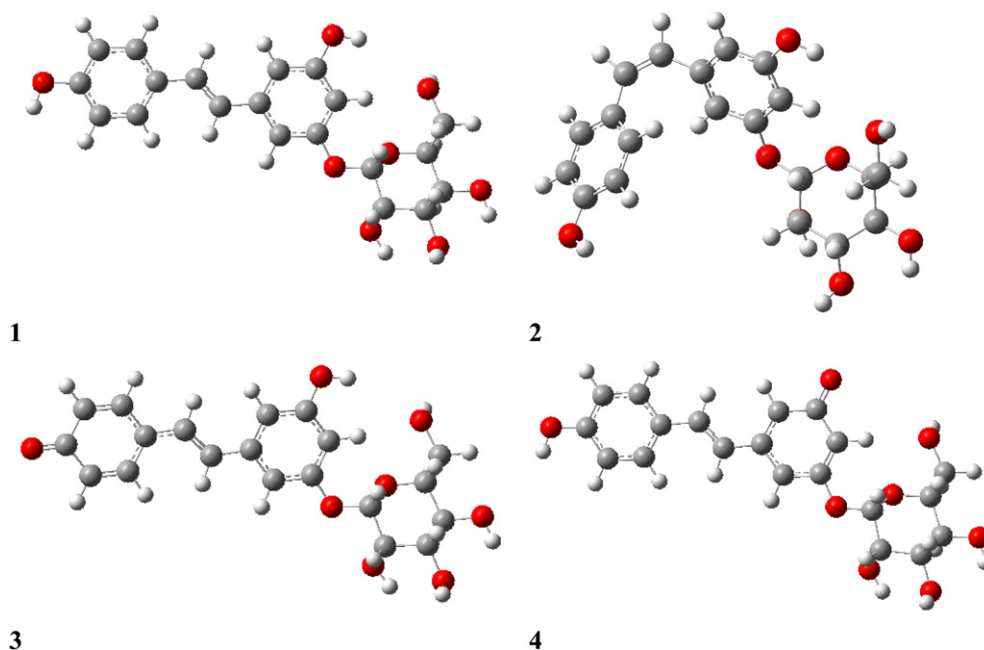


Fig. 7. The B3LYP/6-311G(d,p) fully optimized structures of *trans*-piceid (1), *cis*-piceid (2), 4'-O-radical of *trans*-piceid (3) and 5-O-radical of *trans*-piceid (4).

most energetically stable phenoxy radicals of the compounds examined.

The solvent effects were computed by using the polarizable conductor salvation model (CPCM) [26] as implemented in the Gaussian 03W program. In this model, water is assumed as a macroscopic continuum characterized by the dielectric constant $\epsilon = 78.39$. The UAO model of salvation radii was used in the computations to build the cavity. The UAO cavity is built-up using the united atom topological model UATM [27] applied on atomic radii of the universal force field UFF. The CPCM computations were performed with tesserae of 0.2 \AA^2 average size. The solvent effect in the conformational equilibrium was obtained for the optimized most stable the antioxidants studied and their cation radicals in the gas phase, at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory. We investigated only the influence of the solvent effects on AIP values because cation radicals are charged species and thus they able to strongly interact with polar environment.

3. Results and discussion

3.1. Molecular structures of the chemical compounds studied and the structure–antioxidant activity relationships

At the first step we performed conformational analysis to look for the features that could be related to the antioxidant properties

of the compounds investigated. The results obtained indicate that the hydrogen atoms from all OH groups practically lie in the surface of phenyl rings of all compounds, their phenoxy radicals and cation radicals. A close inspection of the calculated O–H (Table 1) bond lengths in the compounds studied in the gas phase reveals that these lengths have similar values. For example, the bond lengths in the stereochemical forms of *trans*- δ -viniferin take practically identical values. In *trans*- ϵ -viniferin, *trans*-4,4'-DHS dimer and gnetin H the 4-O–H bond is slightly longer than other ones, whereas in *trans*-resveratrol the 4'-O–H bond is longer than the other ones. On the basis of this result we can conclude that from the among hydroxyl bonds the 4'-O–H and 4-O–H bonds seem to be weak. This result suggests that the hydroxyl bonds in the *trans*-stilbene moiety can be easily broken by free radicals in biological systems. In stereoisomers of *trans*- δ -viniferin we observe that the 3-O–H and 5-O–H bonds have similar length. Also, the geometric stereoisomers of ϵ -viniferin and piceid are characterized by similar values of the O–H bond lengths. It is interesting to note that in the glucosides studied and *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide there are differences in the lengths of 5-O–H, 3-O–H and 4'-O–H bonds, in particular, the 4'-O–H bond is shorter than the other ones. This result is probably related to the presence of the glucopyranose and glucuronic acid fragments connected with the *trans*-stilbene skeleton. It should be stressed that in water medium the O–H bond lengths in all the compounds studied are shorter than in the gas

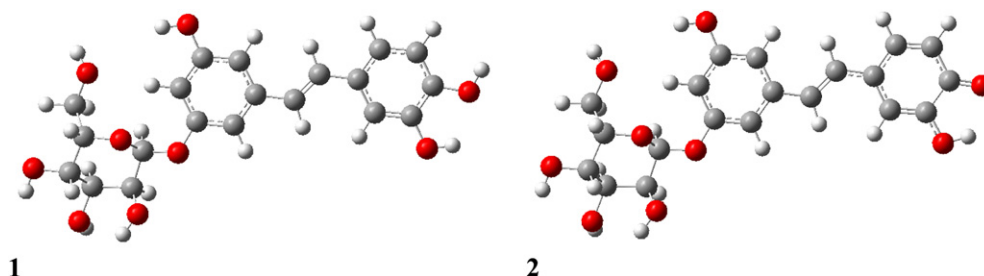


Fig. 8. The B3LYP/6-311G(d,p) fully optimized structures of *trans*-astringin (1) and its 4'-O-radical (2).

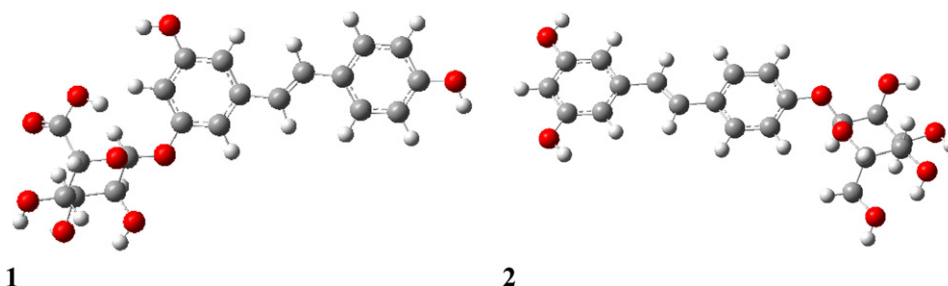


Fig. 9. The B3LYP/6-311G(d,p) fully optimized structure of *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide (1) and *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside (2).

phase. This finding is correlated with more energetic stability of the neutral compounds in this polar environment.

As follows from the calculated values of the α ($C_5-C_4-C_7-C_8$) and θ ($C_7-C_8-C_9-C_{10}$) dihedral angles (Table 2), the *trans*-stilbene moiety in dimer of *trans*-4,4'-DHS and gnetin H shows large deviation from planarity (Fig. 3), while the optimized molecular conformation of stereoisomers of *trans*- δ -viniferin, glucosides (Figs. 7 and 8) and *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide (Fig. 9) slightly deviates from planarity in the gas phase. The geometry of the *trans*- δ -viniferin-B molecule is less deviated from planarity than that of *trans*- δ -viniferin-A. The result obtained also demonstrates that in *cis*- ϵ -viniferin and *cis*-piceid the *cis*-stilbene moiety is particularly strongly deviated from planarity in the both mediums studied. However, the optimized values of these angles indicate that the geometry of *trans*-resveratrol and *trans*-4,4'-DHS is strictly planar in the global minimum of energy. Thus, as follows, *trans*-piceid, *trans*-astringin, stereoisomers of *trans*- δ -viniferin, *trans*-resveratrol, *trans*-4,4'-DHS and *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide may be efficient electron and hydrogen from hydroxyl groups donors due to the stacked planar fragment of the compounds considered and π - π stacking interactions. In water medium the *trans*-stilbene moiety of the compounds studied is strictly planar, which suggests that in water the biological activity of these systems should be higher than in the gas phase.

Analysis of the geometrical properties of the optimized geometry of pallidol (Fig. 3) reveals significant deformation of the bicyclo[3.3.0]octane moiety skeleton which is strongly deviated from planarity. The optimized values of the angles $C_{13}-C_{14}-C_{15} = 114.41^\circ$ and $C_7-C_{22}-C_{21} = 114.40^\circ$ confirm the evidently bent geometry of this moiety.

All fully optimized phenoxy radical forms (Fig. 4) of the compounds studied have semi-quinone structure, in which the unpaired electron is delocalized along the *trans*-stilbene moiety, phenyl rings and the vinyl bond. Also, cation radicals examined have strictly planar *trans*-stilbene skeleton in the environments studied. This planar conformation may greatly affect the radical scavenging activity because it provides energetically advantageous delocalization of the unpaired electron over the whole skeleton of these open-shell chemical systems.

The energy analysis shows (Tables 3 and 4) that all cation radicals and phenoxy radicals investigated are less stable than neutral compounds and that all 4'-O and 4-O-radicals of *trans*-resveratrol, *trans*-4,4'-DHS, dimer of *trans*-4,4'-DHS, *trans*-piceid, stereoisomers of *trans*- ϵ -viniferin, gnetin H, *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide as well as 3-O-radical of stereoisomers of *trans*- δ -viniferin and pallidol are slightly more stable than the other ones. The water medium contributes to the energetic stability of the all open-shell systems studied that is greater than in the gas phase. Moreover, it seems that the vinyl bond connecting phenyl rings ensures effective delocalization of this electron on the whole 4'-O-radical of *trans*-piceid, of *trans*-astringin, *trans*-resveratrol, *trans*-

4,4'-DHS and *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide. In our opinion the strong bend of the bicyclo[3.3.0]octane skeleton in pallidol is a major structural feature responsible for the increase in the energetic stability of 3-O-phenoxy radical of this molecule. Comparing the energetic stability of the geometric stereoisomers, we find that *trans* stereoisomers are more stable than *cis* stereoisomers. Probably, the highly distorted stilbene moiety of *cis* stereoisomers mainly contributes to the increased energy of these isomers. Small values of the relative energies of geometric stereoisomers (6.176 kcal/mol for piceid and 4.918 kcal/mol for ϵ -viniferin) suggest the high torsional flexibility of the stilbene moiety in these stereoisomers.

All fully optimized resonance forms of 3-O-phenoxy radical of *trans*- δ -viniferin-A and 4-O-phenoxy radical of *trans*- ϵ -viniferin have semi-quinone structure (Fig. 6) with planar *trans*-stilbene moiety and are almost isoenergetic, hence these forms show similar energetic stability. For example, the molecular energies of the resonance forms of 3-O-radical of *trans*- δ -viniferin-A are -1531.293912 hartree. While these energies of resonance forms of 4-O-radical of *trans*- ϵ -viniferin are -1531.301599 hartree. As 4-O-radicals of *trans*- ϵ -viniferin and *trans*-piceid have a greater number of resonance structures (Figs. 10–12) and are more energetically stable than 3-O-radical of *trans*- δ -viniferin-A (Fig. 13) we conclude that the resonance effect contributes more to energetic stability of 4-O-radicals of these compounds.

3.2. BDE, AIP, HOMO orbital distribution and spin density in phenoxy radicals

Generally, there are two mechanisms by which antioxidants scavenge free radicals in biological systems. The first mechanism is based on a direct hydrogen abstraction from the antioxidant [28],

Table 3

Total molecular energies [hartree] of the antioxidants studied and their cation radicals calculated at B3LYP/6-311G(d,p) level of theory in the gas phase.

Compounds	Neutral molecule	Cation radical
<i>Trans</i> -resveratrol ^a	−766.571046	−766.320752
<i>Trans</i> -4,4'-DHS ^a	−691.328146	−691.086933
Dimer of <i>trans</i> -4,4'-DHS	−1381.451063	−1381.218174
<i>Trans</i> - ϵ -viniferin	−1531.937212	−1531.694116
<i>Cis</i> - ϵ -viniferin	−1531.929374	−1531.683664
<i>Trans</i> - δ -viniferin-A	−1531.936721	−1531.698985
<i>Trans</i> - δ -viniferin-B	−1531.940825	−1531.704586
Gnetin H	−2297.304937	−2297.070738
Pallidol	−1531.958443	−1531.712288
<i>Trans</i> -piceid	−1377.479134	−1377.238764
<i>Cis</i> -piceid	−1377.468431	−1377.225878
<i>Trans</i> -astringin	−1452.721267	−1452.483085
3-O-glucuronide	−1451.532469	−1451.304545
<i>Trans</i> -resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside	−1377.479474	−1377.232662

^a From Ref. [31].

Table 4

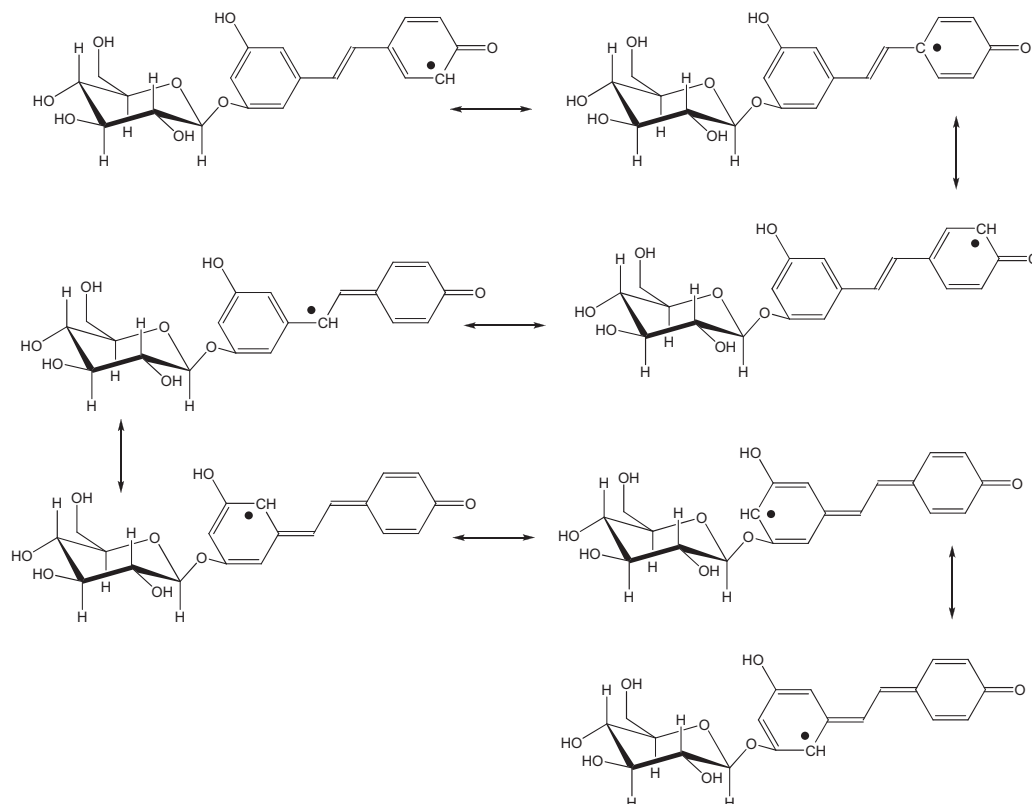
Total molecular energies [hartree] of phenoxy radicals of the compounds studied calculated at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory in the gas phase.

Compounds	4'-O-radical	4-O-radical	1-O-radical	2-O-radical	3-O-radical	5-O-radical
<i>Trans</i> -resveratrol	−765.93485	–	–	–	–	−765.92798
<i>Trans</i> -4,4'-DHS	−690.69372	–	–	–	–	–
Dimer of <i>trans</i> -4,4'-DHS	–	−1380.81704	−1380.80820	−1380.80762	–	–
<i>Trans</i> - ϵ -viniferin	–	−1531.30152	−1531.29435	−1531.29456	−1531.29423	–
<i>Cis</i> - ϵ -viniferin	–	−1531.29137	−1531.28697	−1531.28669	−1531.28664	–
<i>Trans</i> - δ -viniferin-A	–	−1531.29364	−1531.29373	–	−1531.29391	–
<i>Trans</i> - δ -viniferin-B	–	−1531.29721	−1531.29669	–	−1531.29807	–
Gnetin H	–	−2296.66995	−2296.66198	–	−2296.66172	−2296.66270
Pallidol	−1531.31731	−1531.31734	–	−1531.31811	−1531.31866	–
<i>Trans</i> -piceid	−1376.84410	–	–	–	–	−1376.83302
<i>Cis</i> -piceid	−1376.83178	–	–	–	–	−1376.82446
<i>Trans</i> -astringin	−1452.10043	–	–	–	–	−1452.07638
3-O-glucuronide	−1450.89592	–	–	–	–	−1450.88723
<i>Trans</i> -resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside	–	–	–	–	−1376.83316	−1376.83316

while the second mechanism involves the proton-concerned electron transfer process [29]. It should be stressed that the first pathway dominates in nonpolar solvents and is characterized by BDE, whereas the second mechanism occurs rather in polar solvents and can be measured by AIP. The hydrogen transfer mechanism describes transfer of hydrogen atom from antioxidant to free radicals. It is preferable when BDE of hydroxyl bonds reaches small values. Note that if the second mechanism is followed, the reactivity of polyphenols can be estimated by susceptibility of antioxidants to electron donation. The chemical compound is able to act as antioxidant according to this mechanism when is characterized by small value of AIP.

As seen from Table 5, all the compounds studied have the AIP values lower than *trans*-resveratrol. From the values of AIP it can be generally concluded that the dimers and trimer of *trans*-resveratrol

have high ability to donate electrons during interaction with harmful free radicals in biological systems. From among the monomers and glucosides studied *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide and *trans*-4,4'-DHS are very sensitive to electron donation, whereas dimer of *trans*-4,4'-DHS is the most susceptible to electron donation from among the oligomers studied. Comparison of values of AIP for stereoisomers of δ -viniferin and ϵ -viniferin shows that *trans*- δ -viniferin-B has slightly smaller ability to donate single electron than *trans*- δ -viniferin-A, whereas *cis* stereoisomers of ϵ -viniferin and piceid are less susceptible to donor electron than *trans* isomers. Probably, the geometry of stilbene moiety strongly deviated from planarity in these stereoisomers and their cation radicals, contributes to this result. Similarly, *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside is less efficient donor of electron than *trans*-piceid. Hence, we can conclude that the location of the

**Fig. 10.** Molecular structures of the resonance forms of 4-O-radical of *trans*-piceid.

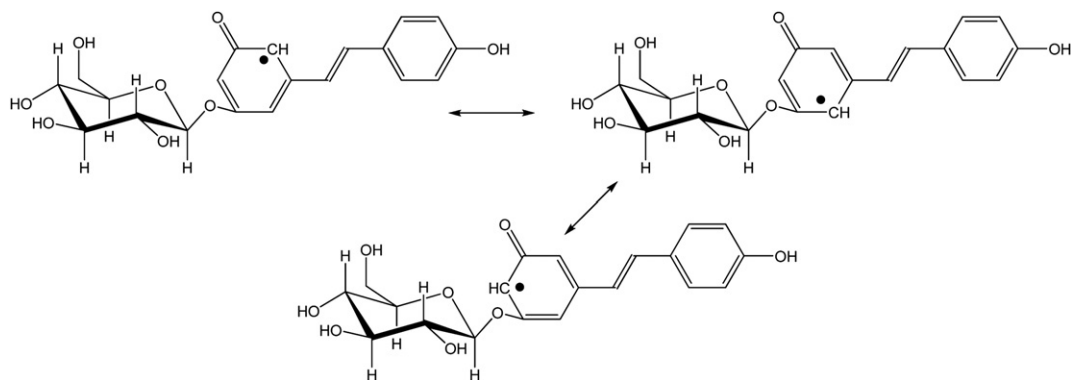


Fig. 11. Molecular structures of the resonance forms of 5-O-radical of *trans*-piceid.

glucopyranose fragment has high influence on the electron donation capacity of the antioxidant.

As follows from the values of AIP, pallidol is characterized by the smallest ability to donate electron in comparison with the other oligomers studied. A close inspection of pallidol and its cation radical structure reveals that the lack of *trans*-stilbene moiety and the presence of bicyclo[3.3.0]octane skeleton can correlate with the high value of AIP of this compound.

A significant influence of water medium on AIP values was observed (Table 6) as the values of this antioxidant factor in water medium were dramatically lower than in the gas phase because cation radicals are charged and quite sensitive to the polarity of various solvents. Moreover, the strictly planar geometry of *trans*-stilbene moiety in this medium contributes to decrease AIP values. The values of AIP indicate that 3-O-glucuronide of *trans*-resveratrol and *trans*-4,4'-DHS are the most efficient electron donors from among the compounds studied and that all oligomers and

glucosides studied are more efficient electron donors than *trans*-resveratrol.

Analysis of BDE values (Table 7) reveals that the 4-O-H bonds in the *trans*-stilbene moiety of stereoisomers of ϵ -viniferin, dimer of *trans*-4',4'-DHS, gnetin H and 3-O-H bond in stereoisomers of *trans*- δ -viniferin are the weakest, thus these groups mainly determine the antioxidant activity of these compounds in the real biological systems. Note that comparing BDE values of hydroxyl bonds in stereoisomers of *trans*- δ -viniferin we observe that this factor has similar values for all hydroxyl groups of corresponding stereoisomer. Therefore, in these stereoisomers all hydroxyl groups have similar abilities to donate hydrogen from hydroxyl bonds. However, the values of BDE of O-H bond in *trans*- δ -viniferin-A smaller than in *trans*- δ -viniferin-B indicate that *trans*- δ -viniferin-A is more able to hydrogen donation than *trans*- δ -viniferin-B. The QSAR analysis performed for these stereoisomers suggests that *trans* configuration of the c- and d-phenyl rings can have great effect on the

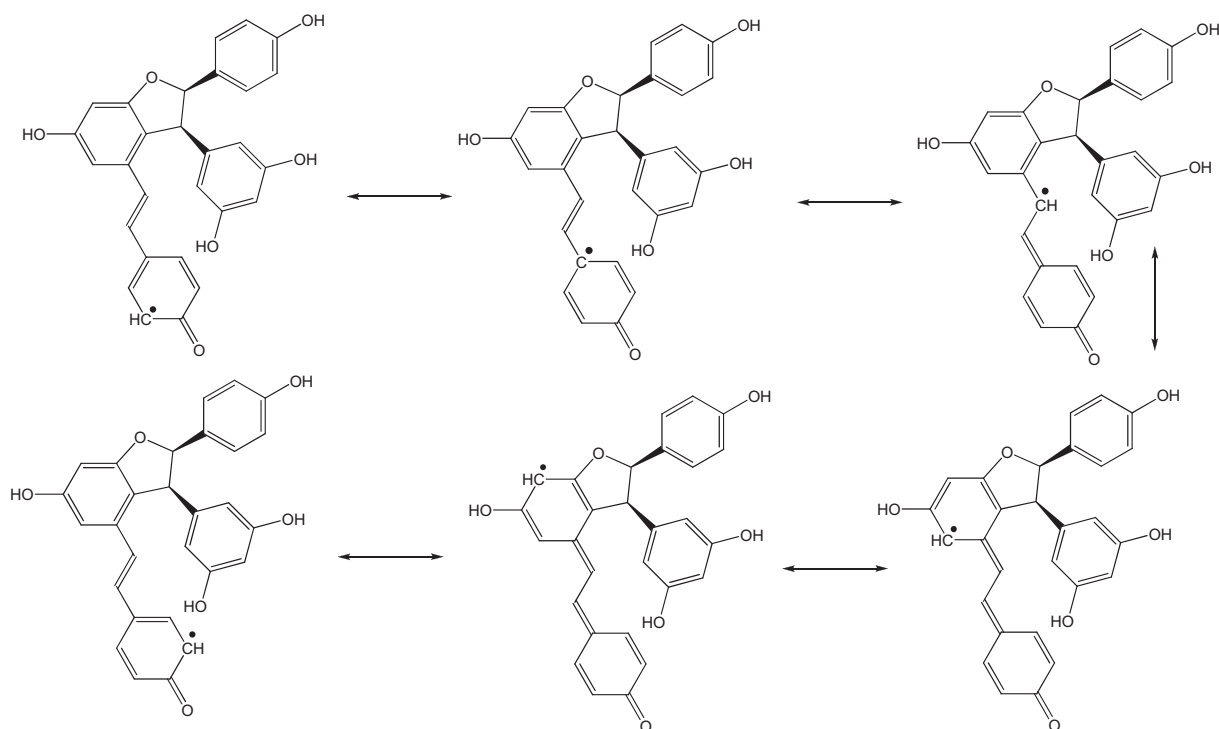


Fig. 12. Molecular structures of the resonance forms of 4-O-radical of *trans*- ϵ -viniferin.

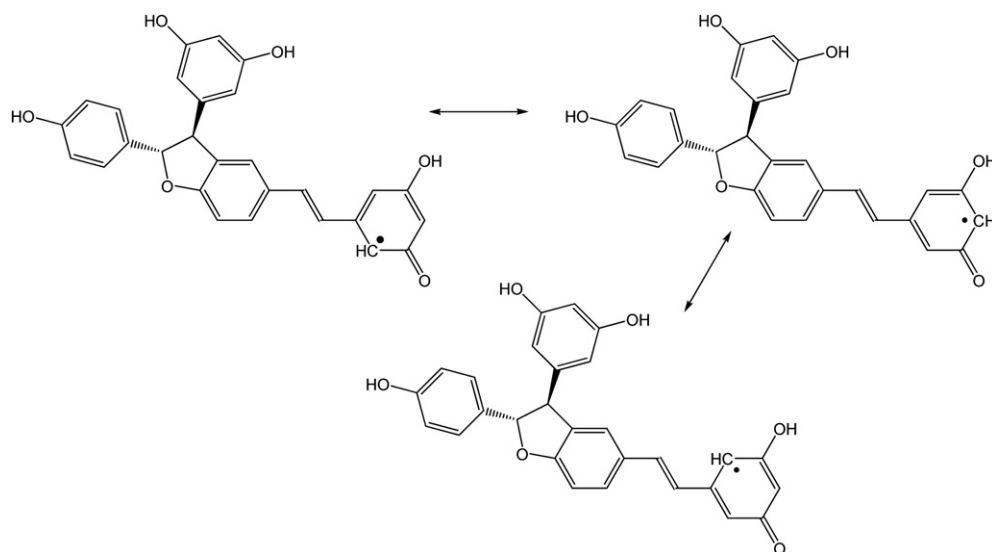


Fig. 13. Molecular structures of the resonance forms of 3-O-radical of *trans*- δ -viniferin-A.

decrease in hydrogen-donating capacity of *trans*- δ -viniferin-B. Moreover, in *trans*- ϵ -viniferin and *trans*-piceid 4'-O-H bond is weaker than in *cis* stereoisomer, which proves that the *trans* geometric stereoisomers of ϵ -viniferin and piceid are characterized by the higher ability of 4'-OH group to donor hydrogen than their *cis* stereoisomers.

The values of BDE of hydroxyl bonds in pallidol are very similar. Probably highly symmetric geometry of this compound determines this similarity. On the basis of the fact that in pallidol all hydroxyl bonds have similar stability, we conclude that all OH groups are similarly reactive in scavenging free radicals. Therefore, this compound can be an efficient scavenger of free radicals free radicals.

Analysis of BDE and AIP values for all compounds shows that AIP values are significantly higher than those of BDE. Summarizing, the results obtained lead to the conclusion that H-atom transfer takes the main part in scavenging of free radicals by the antioxidants studied and this mechanism dominates over the single-electron transfer. The important work by Wright et al. [30] has demonstrated that hydrogen transfer mechanism for free radicals scavenging was the dominant mechanism for several classes of

polyphenolic antioxidants. Our results prove that this mechanism is also preferred in oligomers and glucosides.

It should be emphasized that the BDE values of 4'-O-H bond in *trans*-resveratrol, *trans*-piceid and *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide are similar and smaller than that of 5-O-H bond. Therefore, we can conclude that *trans*-resveratrol, *trans*-piceid and *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide have similar ability to donate hydrogen and that in these compounds 4'-OH group is mainly responsible for the antioxidant capacity. Probably, the presence of the glucopyranose fragment contributes to the weakness of 4'-O-H bond. Since *trans*-piceid and *trans*-astringin are the major components of red wine, the results obtained indicate that the medicinal activity of red wines can be associated with the presence of these glucosides of *trans*-resveratrol. Note that BDE of 4'-O-H bond in *trans*-astringin is the lowest from among all antioxidants studied. Hence, *trans*-astringin is a particularly strong antioxidant which acts according to the H-atom transfer mechanism. On the basis of the findings obtained we can conclude that *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide, which is a metabolite of *trans*-resveratrol in living organisms, can be a potential strong antioxidant. Our results have for the first time theoretically proved the potential free radicals scavenging activity

Table 5

AIP [kcal/mol] values of dimer of *trans*-4,4'-DHS, pallidol, stereoisomers of ϵ -viniferin, *trans*- δ -viniferin-B, *trans*- δ -viniferin-A, gnetin H, *trans*-resveratrol, *trans*-4,4'-DHS, *trans*-piceid, *cis*-piceid, *trans*-astringin and *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide calculated at B3LYP/6-311G(d,p) level in the gas phase.

Compounds	AIP
<i>Trans</i> -resveratrol ^a	157.061
<i>Trans</i> -4,4'-DHS ^a	152.212
Dimer of <i>trans</i> -4,4'-DHS	146.140
<i>Trans</i> - ϵ -viniferin	152.545
<i>Cis</i> - ϵ -viniferin	154.185
<i>Trans</i> - δ -viniferin-A	149.181
<i>Trans</i> - δ -viniferin-B	148.242
Gnetin H	146.967
Pallidol	154.465
<i>Trans</i> -piceid	150.835
<i>Cis</i> -piceid	152.204
<i>Trans</i> -astringin	149.461
3-O-glucuronide	143.024
<i>Trans</i> -resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside	154.877

^a From Ref. [31].

Table 6

AIP [kcal/mol] values of *trans*-4,4'-DHS dimer, pallidol, stereoisomers of ϵ -viniferin, *trans*- δ -viniferin-B, *trans*- δ -viniferin-A, gnetin H, *trans*-resveratrol, *trans*-4,4'-DHS, *trans*-piceid, *cis*-piceid, *trans*-astringin, *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide and *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside calculated at B3LYP/6-311G(d,p) level in water medium.

Compounds	AIP
<i>Trans</i> -resveratrol ^a	118.940
<i>Trans</i> -4,4'-DHS ^a	113.380
Dimer of <i>trans</i> -4,4'-DHS	116.160
<i>Trans</i> - ϵ -viniferin	117.897
<i>Cis</i> - ϵ -viniferin	119.839
<i>Trans</i> - δ -viniferin-A	116.189
<i>Trans</i> - δ -viniferin-B	118.778
Gnetin H	116.569
Pallidol	118.887
<i>Trans</i> -piceid	117.524
<i>Cis</i> -piceid	119.125
<i>Trans</i> -astringin	117.003
3-O-glucuronide	115.210
<i>Trans</i> -resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside	119.231

^a From Ref. [31].

Table 7

BDE [kcal/mol] of the hydroxyl bonds in dimer of *trans*-4,4'-DHS, pallidol, stereoisomers of ϵ -viniferin, *trans*- δ -viniferin-A and B, gnetin H, *trans*-resveratrol, *trans*-4,4'-DHS, stereoisomers of piceid, *trans*-astringin, *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide and *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside calculated at B3LYP/6-311G(d,p) level.

Compounds	4-O-H	4'-O-H	2-O-H	2'-O-H	3-O-H	3'-O-H	1-OH	5-O-H	5'-O-H
<i>Trans</i> -resveratrol ^a	–	78.683	–	–	82.876	–	–	82.876	–
<i>Trans</i> -4,4'-DHS ^a	77.663	77.663	–	–	–	–	–	–	–
Dimer of <i>trans</i> -4,4'-DHS	77.392	–	83.095	–	–	–	82.085	–	–
<i>Trans</i> - ϵ -viniferin	78.398	–	82.582	–	82.846	82.846	82.763	–	–
<i>Cis</i> - ϵ -viniferin	79.871	–	82.479	–	82.678	–	82.753	–	–
<i>Trans</i> - δ -viniferin-A	83.151	–	82.632	–	82.709	–	82.632	82.709	–
<i>Trans</i> - δ -viniferin-B	96.601	–	96.956	–	96.004	–	96.956	96.004	–
Gnetin H	77.972	82.805	–	–	82.795	82.795	82.805	82.795	82.795
Pallidol	81.764	81.746	81.303	81.303	80.906	80.906	–	–	–
<i>Trans</i> -piceid	–	78.004	–	–	–	–	–	84.562	–
<i>Cis</i> -piceid	–	78.962	–	–	–	–	–	83.354	–
<i>Trans</i> -astringin	–	69.464	–	–	–	83.786	–	83.889	–
3-O-glucuronide	–	78.883	–	–	–	–	–	84.072	–
<i>Trans</i> -resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside	–	–	–	–	84.764	–	–	84.764	–

^a From Ref. [31].

of *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide conjugate. The values of BDE of 3-O-H and 5-O-H bonds of *trans*-resveratrol and *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside indicate that *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside has smaller ability to donate hydrogen than *trans*-resveratrol. This result testifies to the validity of the result obtained by Kim et al. [4], who claimed that this glucoside can be a weaker antioxidant than *trans*-resveratrol in the process of lipid peroxidation inhibition.

Another descriptor which is connected with the antioxidant properties of the compounds investigated is the HOMO orbital distribution. The sites in the molecules characterized by high density of the HOMO distribution are very sensitive to the attack of free radicals and other reactive agents. The more HOMO orbital is delocalized, the more numerous are the electron sites and more redox reactions will occur. As follows from the three-dimensional distribution of HOMO orbital (Fig. 5), the hydroxyl groups from *trans*-stilbene moiety of the compounds examined can be easily attacked by free radicals because the HOMO orbital distribution is particularly high on these hydroxyl bonds. It should be pointed out that a significant HOMO contribution from the double bond and phenyl rings in *trans*-stilbene skeleton indicates that the vinyl bond can be the reactive centre in the compounds having this bond. The density of the HOMO orbital in the *trans*-stilbene molecular fragment is significantly higher than in the other areas of the compounds studied. Note that for gnetin H, the HOMO orbital distribution in *trans*-stilbene moiety and phenyl groups is practically vestigial, while the central moiety of this molecule is characterized by high density of the HOMO distribution. Probably, this result can be associated with the high steric hindrances, the presence of additional phenyl ring in this compound and the unique geometry of the central fragment.

The spin density of the unpaired electron is an important factor which influences the energetic stability of phenoxy radicals and antioxidant potency of the corresponding compound.

Table 8

The spin density on the oxygen atoms in phenoxy radicals of *trans*-piceid, *cis*-piceid, *trans*-astringin, *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide, *trans*-resveratrol, *trans*-4,4'-DHS and *trans*-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside calculated at B3LYP/6-311G(d,p) level.

Compounds	4'-O	3'-O	5-O
<i>Trans</i> -resveratrol ^a	0.3529	–	0.4488
<i>Trans</i> -4,4'-DHS ^a	0.3424	–	–
<i>Trans</i> -piceid	0.3486	–	0.4679
<i>Cis</i> -piceid	0.3694	–	0.4539
<i>Trans</i> -astringin	0.3332	0.4378	0.4697
3-O-glucuronide	0.3537	–	0.4645
<i>Trans</i> -resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside	–	–	0.4734

^a From Ref. [31].

Table 9

The spin density on oxygen atoms in the most stable phenoxy radicals of *trans*- δ -viniferin-A, *trans*- δ -viniferin-B, stereoisomers of ϵ -viniferin, pallidol, gnetin H and *trans*-4,4'-DHS dimer calculated at the unrestricted B3LYP/6-311G(d,p) level.

Compounds	Spin density
Dimer of <i>trans</i> -4,4'-DHS	0.3388
Pallidol	0.4357
<i>Trans</i> - ϵ -viniferin	0.3480
<i>Cis</i> - ϵ -viniferin	0.3734
<i>Trans</i> - δ -viniferin-A	0.4478
<i>Trans</i> - δ -viniferin-B	0.4476
Gnetin H	0.3489

The low value of the spin distribution relates to greater energetic stability of these radicals. Besides, the lower value of spin density on oxygen in phenoxy radicals is correlated with the stronger ability of the compounds to scavenge free radicals. The calculated values of spin density in the oligomers studied show that the lowest contribution comes from the oxygen atoms at the *trans*-stilbene moiety in stereoisomers of *trans*- δ -viniferin, stereoisomers of ϵ -viniferin and gnetin H. Therefore, the lowest contribution of spin density on these oxygen atoms explains the high free radical scavenging activity of these oligomers. Analysis of spin density values in the most energetically stable conformations (Table 9) of phenoxy radicals of the oligomers studied shows that 4-O-phenoxy radical of *trans*-4,4'-DHS dimer is characterized by the lowest density on 4-O oxygen atom, hence in this dimer the 4-O-H bond is especially susceptible to breaking. Note that the calculation of BDE of this bond confirms this result. Analysis of the spin density (Table 8) values reveals that the contribution from 4'-O atom in *trans*-resveratrol, *trans*-piceid, *trans*-astringin and *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide is smaller than those from the other oxygen atoms. The lowest value of spin density in 4'-O-radical of *trans*-astringin shows that this compound is an excellent antioxidant particularly susceptible to hydrogen abstraction from 4'-OH group. It should be pointed out that the higher values of the spin density on 4'-O atom in the 4'-O-phenoxy radicals of *cis*- ϵ -viniferin and *cis*-piceid than those for *trans* stereoisomers indicate that 4'-OH group in *trans* stereoisomers is more susceptible to the attack of free radicals than those in its *cis* stereoisomers.

4. Conclusions

The calculations have proved that all oligomers of *trans*-resveratrol, *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide and glucosides studied exhibit remarkably higher antioxidant activity than *trans*-

resveratrol and that *trans* stereoisomers of ϵ -viniferin and piceid are more efficient antioxidants than their *cis* stereoisomers. We have demonstrated that the hydroxyl bonds in *trans*-stilbene skeleton of the oligomers studied are particularly able to scavenge free radicals and that the planar geometry of the *trans*-stilbene moiety ensures the favourable delocalization of unpaired electron in phenoxy radicals and cation radicals. From the results obtained the dimer of *trans*-4,4'-DHS and *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide are predicted to be potential antioxidants in living organisms. The H-atom transfer mechanism is indicated as the most important for the antioxidants investigated and dominant over that of single-electron transfer in the mediums studied. The computations have shown that in the water medium all antioxidants studied are more likely to donate electron than in the gas phase. Since, *trans*-resveratrol, pallidol, *trans*- δ -viniferin, *trans*- ϵ -viniferin and glucosides are found in red wine, our study shows that the pharmaceutical properties of red wine can be related to the presence of these compounds. Moreover, it has been shown that the components of *P. lactiflora* and *V. vinifera* can function as free radical scavengers. Summarizing, our study contributes to the understanding of the antioxidant activity of the compounds studied for exploitation in the food chemistry, medicine and pharmacy.

Acknowledgements

This study is supported by the PCSS grant no. 60 "Investigation of the biophysical and chemical properties of *trans*-resveratrol". We are indebted to Professor Jerzy Konarski and Małgorzata Szeląg for many helpful and stimulating discussions and to Msc Maria Spychalska and PhD Piotr Stępień for invaluable linguistic assistance.

References

- [1] D.K. Das, M. Sato, P.S. Ray, G. Maulik, R.M. Engelman, A.A. Bertelli, A. Bertelli, *Drugs Exp. Clin. Res.* 25 (1999) 115–120.
- [2] H.J. Kim, S.K. Chung, S.W. Choi, *J. Food Sci. Nutr.* 3 (1998) 315–319.
- [3] H.J. Kim, E.J. Jang, S.J. Bae, S.M. Shim, H.D. Park, C.H. Rhee, J.H. Park, S.W. Choi, *Arch. Pharm. Res.* 25 (2002) 293–299.
- [4] H.J. Kim, E.J. Chang, S.H. Cho, S.K. Chung, H.D. Park, S.W. Choi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (9) (2002) 1990–1993.
- [5] C. Privat, J.P. Telo, V. Bernardes-Genisson, A. Vieira, J.-P. Soucard, F. Nepveu, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1213–1217.
- [6] M. Wang, Y. Jin, C.-T. Ho, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 3974–3977.
- [7] K. Fukuhara, M. Nagakawa, I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Imai, S. Urano, S. Fukuzumi, T. Ozawa, N. Ikota, M. Mochizuki, N. Miyata, H. Okuda, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 1437–1443.
- [8] G.J. Fan, X.-D. Liu, Y.-P. Qian, Y.-J. Shang, X.-Z. Li, F. Dai, J.G. Fang, X.-L. Jin, B. Zhou, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 2360–2365.
- [9] X. Vitrac, A. Bornet, R. Vanderlinde, J. Valls, T. Richard, J.-C. Delaunay, J.-M. Mérillon, P.-L. Teissédre, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5664–5669.
- [10] P. Waffo-Teguo, D. Lee, M. Cuendet, J.M. Mérillon, J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, *J. Nat. Prod.* 64 (2001) 136–138.
- [11] S. He, L. Jiang, B. Wu, Y. Pan, C. Sun, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379 (2009) 283–287.
- [12] H.J. Kim, M. Saleem, S.H. Seo, C. Jin, Y.S. Lee, *Plant Med.* 71 (2005) 973–976.
- [13] H.A. Guebailia, K. Chira, T. Richard, T. Mabrouk, A. Furiga, X. Vitrac, J.-P. Monti, J.-C. Delaunay, J.-M. Mérillon, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9559–9564.
- [14] Ch. Yu, Y.G. Shin, A. Chow, Y. Li, J.W. Kosmeder, Y.S. Lee, W.H. Hirschelman, J.M. Pezzuto, R.G. Mehta, R.B. van Breemen, *Pharm. Res.* 19 (2001) 1907–1914.
- [15] F. Caruso, J. Tanski, A. Villegas-Estrada, M. Rossi, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7279–7285.
- [16] J.P. Perdew, Y. Wang, *Phys. Rev. B* 45 (1992) 13244.
- [17] B. Delley, *J. Chem. Phys.* 100 (1996) 6107.
- [18] F. Orsini, F. Pellizzoni, L. Verotta, T. Aburjai, C.B. Rogers, *J. Nat. Prod.* 60 (1997) 1082–1087.
- [19] M.S. Pour Nikfardjam, G. Laszlo, H. Dietrich, *Food Chem.* 96 (2006) 74–79.
- [20] A.I. Romer-Perez, M. Ibern-Gornez, R.M. Larnuela-Raventos, M.C. de la Torre-Boronat, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1533–1536.
- [21] S. Fabris, F. Momo, G. Ravagnan, R. Stevanato, *Biophys. Chem.* 135 (2008) 76–83.
- [22] B. Fauconneau, P. Waffo-Teguo, F. Huguet, L. Barrier, A. Decendit, J.-M. Merillon, *Life Sci.* 61 (1997) 2103–2110.
- [23] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Roob, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Menucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian 03, Revision C.02. Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2004.
- [24] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785.
- [25] A.P. Scott, L. Radom, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 16502.
- [26] A. Klamt, G. Schürmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1993) 799.
- [27] A. Ben-Naim, Y. Marcus, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 2016.
- [28] G.W. Burton, T. Doba, E.J. Gabe, L. Hughes, F.L. Lee, L. Prasad, K.U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 7053.
- [29] S.V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M.G. Simic, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 4846.
- [30] J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1173–1183.
- [31] D. Mikulski, R. Górniak, M. Molski, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1015.



Quantum-chemical study on the antioxidation mechanisms of *trans*-resveratrol reactions with free radicals in the gas phase, water and ethanol environment

Damian Mikulski^{a,*}, Małgorzata Szeląg^{a,c}, Marcin Molski^a, Rafał Górniak^b

^a Department of Theoretical Chemistry, Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, Poland

^b Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, Poland

^c Faculty of Biology, A. Mickiewicz University ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2010

Received in revised form 7 April 2010

Accepted 8 April 2010

Available online 13 April 2010

Keywords:

DFT method

CPCM model

Trans-resveratrol

Antioxidant

Antioxidant indicators

ABSTRACT

To explain the structure–antioxidant activity relationships of *trans*-resveratrol, its anions and phenoxy radical in the gas phase, water and ethanol media, the quantum-chemical calculations based on CPCM solvation model have been performed for the first time. For fully optimised geometries, the antioxidative parameters have been calculated at the B3LYP/6-311G(d,p) and B3LYP/6-311+G(d,p) levels of theory. The calculated values of the Gibbs free enthalpies revealed that the reactions of *trans*-resveratrol with water molecule are thermodynamically unfavourable, while the reaction of this compound with hydroxide anion is thermodynamically preferable in the media studied. The calculations performed have shown that in polar media, the 4'-OH group is a stronger proton donor than the 3-OH group and hence, the 4'-OH group contributes most to the antioxidant activity of *trans*-resveratrol. In addition, it has been established that the ability of 4'-O-monoanion to donate proton is higher than that of 3,4'-O-dianion and 3,5-O-dianion of *trans*-resveratrol in the media investigated. The results obtained demonstrate that the hydrogen atom transfer mechanism for scavenging of free radicals is more preferable than the single-electron transfer or the sequential proton loss electron transfer mechanism in all types of environment. *Trans*-resveratrol is found to be a more active donor of hydrogen atoms in the gas phase than in polar environments and in polar media it is more susceptible to electron and proton donation than in the gas phase. Polar media are shown to stabilise *trans*-resveratrol and its 4'-O-radical, cation radical and all anionic forms stronger than the gas phase. Furthermore, our study shows that the antioxidant capacity of *trans*-resveratrol is related to the planar and semi-quinone structure of its 4'-O-radical and all anionic forms in the environments investigated.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Trans-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene Fig. 1) is a phenolic derivative of *trans*-stilbene mainly found in grapes and red wine. This natural compound has attracted considerable interest since it has a wide variety of desirable biological effects. One of the most striking biological activities of *trans*-resveratrol intensely investigated for the last few years is its antioxidant behaviour in the biological systems [1,2]. The antioxidative features of this compound and its hydroxylated derivatives have been discovered by Murias et al. [3], who studied the mechanism of the reaction of *trans*-resveratrol with peroxy radicals. In particular, the authors have demonstrated that the increased cytotoxicity and antioxidant activity of *trans*-resveratrol is related to the presence of the semi-quinone free radicals formed during metabolism and oxidation. Also, many researchers have investigated the influence of hydroxyl groups on the properties of *trans*-resveratrol and have found that

the 4'-OH group is essential for this compound cytogenetic and antioxidant activities [4]. On the other hand, it has been demonstrated that the antioxidant activity of *trans*-resveratrol and its analogues strongly depends on a few other structural determinants such as the number and location of hydroxyl bonds, intermolecular hydrogen bonds, presence of the vinyl bond [5] and the ability to generate stable resonance forms during interactions with free radicals and other oxidative electrophilic and nucleophilic species.

In parallel to experimental studies, the antioxidative activities of *trans*-resveratrol and its derivatives have been studied theoretically. The antioxidant activities of *trans*-resveratrol and its hydroxylated derivatives have been confirmed by Queriros et al. [6] on the basis of DFT computations in the gas phase. These authors have shown that the antioxidant activity of *trans*-resveratrol is related to the stabilisation energy of the free radicals and the fact that the π -electron system determines the high stability of these radicals. They have proved that the stability of free radicals is determined by the number of the resonance structures.

In the theoretical investigation of the antioxidant activity of *trans*-resveratrol in the gas phase, Wright et al. [7] used the

* Corresponding author. Tel.: +48 607608785.

E-mail address: dmkwant@amu.edu.pl (D. Mikulski).

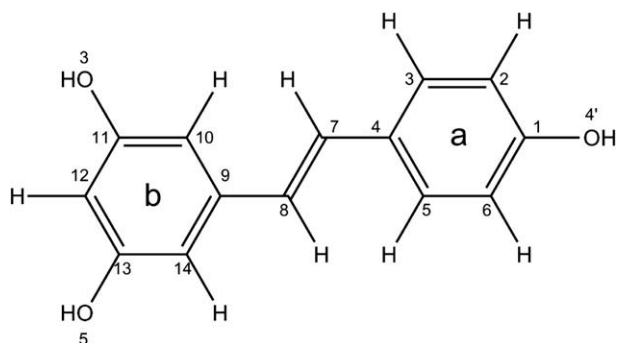


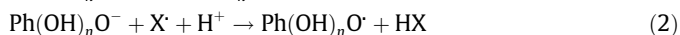
Fig. 1. Molecular geometry of *trans*-resveratrol.

accurate procedure based on the locally dense basis sets (LDBS). Adopting this approach these authors estimated BDE and AIP for *trans*-resveratrol, *trans*-piceatannol and other phenolic antioxidants in the gas phase. Their study reveals that the hydrogen-transfer mechanism by which the antioxidant reacts with free radicals is more preferred than single-electron mechanism.

Also, Caruso et al. [8] have performed quantum computations in the gas phase revealing the antioxidative activity of *trans*-resveratrol. They have proved that proton transfer is the dominant mechanism of the reaction of free radicals with various antioxidants and that *para*-4'-OH group is more acidic than the other hydroxyl groups; this observation correlates with the ability of scavenging free radicals. Unfortunately, in this study the influence of polar solvent on the antioxidant activity has not been taken into consideration. In their work also the structure of *trans*-resveratrol has been determined by X-ray diffraction. On the basis of their results the authors have claimed that this compound is practically planar and that the crystal phase reveals extensive hydrogen bonds, which determine the flip-flop motion of the three hydroxyl bonds. The dynamic behaviour has been suggested to correlate with the antioxidant activity of this compound.

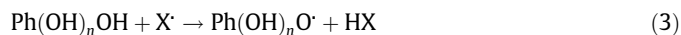
Theoretical study of the antioxidant activity of *trans*-resveratrol has been also undertaken by Cao et al. [9]. Their results indicate that this compound is a strong antioxidant because its radicals have a semi-quinone structure in which the unpaired electron is mainly localised on the O-atoms in *para* and *ortho* positions. The analysis of the spin density also confirms such behaviour of this compound. According to these authors the 4'-hydroxyl group is more reactive than the other ones, while hydroxyl groups and double bond in this compound can contribute to the ability of scavenging free radicals. Unfortunately, the computations reported in this work were performed only in the gas phase, hence give poor insight into the antioxidative activity of *trans*-resveratrol in polar environment of living cells.

It is well known that the harmful free radicals can be deactivated in the interaction with phenolic antioxidants in the following reactions [10]:

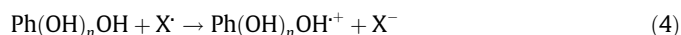


where $\text{Ph(OH)}_n\text{OH}$ denotes a polyphenolic compound. This sequential proton loss electron transfer mechanism (SPLET) is associated with the ability of polyphenols to donate proton. Hence, the smaller values of PDE (proton dissociation enthalpy) make this mechanism more preferable. Note that this mechanism dominates when the environment is strongly basic and polar. In Ref. [10], the hydrogen-transfer mechanism (HAT) has been reported, which describes transfer of hydrogen atom from antioxidant to free

radicals. It is preferable when homolytic dissociation enthalpy (BDE) of hydroxyl bonds reaches small values and it can be written in the following way:



Another possible mechanism by which the polyphenolic compounds interact with free radicals is the electron transfer process from antioxidant to free radical followed by proton transfer (ET-PT mechanism). This mechanism can be written as [10]:



Note that if this mechanism is followed, the reactivity of polyphenols can be estimated by susceptibility of antioxidants to electron donation. The chemical compound is able to act as antioxidant according to this mechanism when is characterised by small value of adiabatic ionisation potential (AIP). These mechanisms clearly show that the neutral forms of phenolic antioxidants and their anions can be effective scavengers of free radicals. It is expected that the pathways on which the antioxidants can play the preventive role will strongly depend on the solvent stabilisation of the charged species. Moreover, in real biological systems the interaction between antioxidants and free radicals takes place in polar and non-polar environments, for, e.g., in membranes, where lipid peroxidation occurs. Therefore, the solvent effects should be taken into theoretical considerations of the antioxidant potency.

Unfortunately, the hitherto theoretical studies of the antioxidant properties of *trans*-resveratrol have been performed in the gas phase. Since the free radical-scavenging action can occur in solution and the solvation effect is very important in biological systems, it is the intention of the present study to take into regard the solvation effect in the quantum-mechanical calculations to get a more reliable description of the antioxidative activity-structure relationships for *trans*-resveratrol in water and ethanol environments. Therefore, in this study we examine the influence of these environments on the physical descriptors characterising the antioxidant efficiency of *trans*-resveratrol. In particular, it will be shown that the antioxidative activity of this compound is strongly related to the geometry of *trans*-resveratrol and its anions, 4'-O-radical as well as cation radical. We also report a detailed analysis of several molecular properties, such as the total molecular energies, molecular geometries, optimised geometrical parameters and the conformational equilibrium along with rotational energy profile. Moreover, the aim of the present study is to elucidate the geometric features of *trans*-resveratrol that can determine the ability of *trans*-resveratrol to scavenge free radicals in the two types of the environment studied. Since phenolic antioxidants can react with free radicals via the three above-mentioned mechanisms, we have performed computations in order to explain the antioxidant action of *trans*-resveratrol according to these mechanisms. Furthermore, on the basis of the antioxidant factors computed (PDE, BDE, AIP) we have pointed the most preferable mechanism of antioxidant activity. Moreover, we have studied the thermodynamics of the reactions of *trans*-resveratrol and its anions with water molecule (Fig. 2). However, to confirm that 3,5,4'-O-trianion can be formed in basic environments, the Gibbs free enthalpies of the reactions of *trans*-resveratrol and its dianions with OH^- anion have been calculated (Figs. 2 and 12). This investigation is novelty of this study in comparison with our previous study [20].

2. Computational methods

All quantum-chemical calculations were performed using the Gaussian 03W computational package [13]. Geometry of

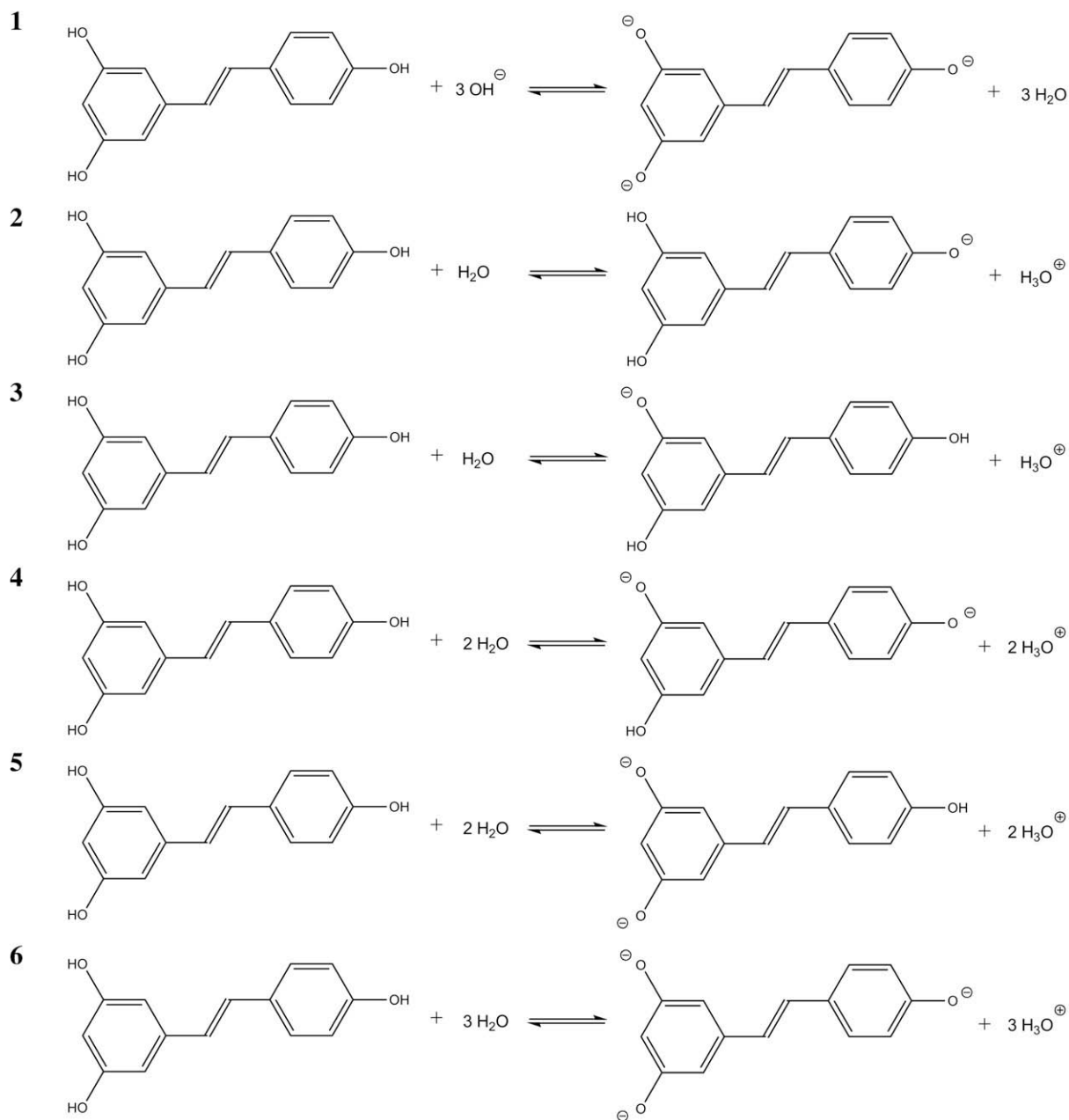


Fig. 2. The reactions of *trans*-resveratrol with water molecule and OH[−] anion.

trans-resveratrol in the gas phase, water and ethanol medium was fully optimised employing DFT method with restricted Becke's three-parameter hybrid functional and the nonlocal Lee, Yang and Parr gradient-corrected correlation functional (rB3LYP) [14,15], together with 6-311G(d,p) and 6-311+G(d,p) functional basis sets. However, for the optimisation of the geometry of the phenoxy radicals and cation radicals the unrestricted uB3LYP/6-311G(d,p) level of theory was applied. In the optimisation process of the structures of 4'-O-radical and cation radical the spin contamination was monitored, because accuracy of the energy evaluation in the case of systems involving open-shell species is sensitive to spin contamination. The mean value of the square of the total spin of 0.750 was maintained. We used uB3LYP functional for open-shell molecular systems because it provides reliable results. The computations for the anions were performed for the optimised structure of the neutral molecule in the global energy minimum, after proton was abstracted from

4'-OH, 3-OH and 5-OH groups. All anions were fully optimised with the use of the 6-311+G(d,p) basis set augmented with diffuse functions for the proper description of ionic systems. To show that the anions were stabilised by resonance, the resonance forms of 4'-O-anion in the gas phase and water environment were investigated. The HOMO orbital distribution and spin density distribution were determined for the fully optimised structure of *trans*-resveratrol and its 4'-O-phenoxy radical.

In order to determine the starting geometry of the compound studied and the approximate location of the minimum energy structures, a conformational analysis was performed. At the first step rotational potential energy profile (Fig. 3) at restricted B3LYP/6-311G(d) level was built by scanning the internal dihedral angles α (C₅–C₄–C₇–C₈) and θ (C₇–C₈–C₉–C₁₀) in the compound studied. The conformational energy maps were obtained through the discrete rotation of these selected angles at 10° increments, over the range from 0° to 180° with constraint on all other

geometrical parameters. Afterwards, the most stable structures obtained from the scan were fully optimised without any symmetry constraints around each potential minimum. For all optimised structures, we calculated the harmonic vibrational frequencies of the corresponding bonds to determine stationary points on the potential energy surface. As the relative hydrogen orientations in OH groups with respect to the ring are also important geometrical parameters, for the most stable geometries obtained from previous full optimisations, the potential energy surfaces describing the relation between these orientations and total energy were built. These surfaces were generated at the B3LYP/6-31G(d) level of theory by changing the dihedral angles β ($C_6-C_1-O_4-H_4$), γ ($C_{10}-C_{11}-O_5-H_5$), φ ($C_{14}-C_{13}-O_3-H_3$), δ ($C_{11}-C_{12}-O_4-H_4$) and α ($C_{10}-C_9-C_8-C_7$) at 60° increments with constraints on all other geometrical parameters. In the calculations we used the angle increment of 60° in order to find out whether in the most stable conformations the hydrogen atoms from the OH groups are in the plane of the molecule or out of its plane. Finally, the most stable conformations obtained from these scans were fully optimised at 6-311G(d,p) level of theory and vibrationally characterised to check for the presence of imaginary frequencies in the minima. The total molecular energies of the compounds studied assumed to have the optimised structures were almost the same. In this way, the most reliable structure of *trans*-resveratrol in the global energy minimum was determined, which seems to be the best theoretical result generated by the methods used in the calculations. All structures were fully optimised using the Berny algorithm and redundant internal coordinates [16]. However, the harmonic vibrational frequencies for fully optimised geometries were computed analytically and scaled by a factor of 0.973 as recommended [17].

Since the 4'-OH group is the most reactive in scavenging free radicals [18], the free radicals without 4'-hydrogen and the anions without 5-, 4'- and 3-protons were studied. Therefore, we studied the 4'-O-monoanion, 5-O-monoanion, 4',3-O-dianion, 3,5-O-dianion and 4',3,5-trianion. The PDE values were calculated using the formula: $PDE = H_{\text{anion}} + H_{\text{proton}} - H_{\text{molecule}}$ in which, H_{anion} is the enthalpy of the anion generated after proton abstraction, H_{proton} is the enthalpy of proton while H_{molecule} stands for the enthalpy of the parent molecule. The PDE values of the O-H bond in anions were computed according to the equations: $PDE = H_{\text{dianion}} + H_{\text{proton}} - H_{\text{anion}}$ and $PDE = H_{\text{trianion}} + H_{\text{proton}} - H_{\text{dianion}}$, where H_{dianion} indicates the total enthalpy of 4',3-O-dianion and 3,5-O-dianion, whereas H_{trianion} is the total enthalpy of 3,5,4'-O-trianion. However, the AIP values were determined according to the following equation: $AIP = E_{\text{cr}} - E_{\text{molecule}}$ where E_{cr} is the corresponding total molecular energy of cation radical generated after electron transfer, while E_{molecule} denotes the total energy of the parent molecule obtained at the 6-311G(d,p) level of theory. Employing the enthalpies in the standard state of 1 atm and 298.15 K, the homolytic BDE values were calculated with the use of the following relationship: $BDE = H_{\text{radical}} + H_{\text{H}} - H_{\text{molecule}}$, where H_{radical} is the total enthalpy of the free radical, H_{H} is the gas-phase total enthalpy of the hydrogen atom (-0.49764 hartree) with the vibrational correction [7], whereas H_{molecule} is the total enthalpy of the parent molecule. The aqueous-phase proton enthalpy of the hydrogen atom is given by the sum of H_{H} and the hydration enthalpy ($\Delta H_{\text{hydr}}[H(g)] = -4$ kJ/mol) of hydrogen atom [23,24]. The ethanol-phase enthalpy of the hydrogen atom was calculated as sum of H_{H} and solvation enthalpy ($\Delta H_{\text{solv}}[H(g)] = 5$ kJ/mol) of the hydrogen atom in weakly polar solvents [23]. To compute the appropriate values of these parameters which determine the radical-scavenging activity, the most stable chemical individuals in the global energy minimum were used. The distributions of the HOMO orbital and spin density were computed for the fully optimised geometry of the compound considered. The total

enthalpies (H_{total}) of the chemical forms examined were estimated using the following formula:

$$H_{\text{total}} = E_0 + \text{ZPE} + \Delta H_{\text{trans}} + \Delta H_{\text{rot}} + \Delta H_{\text{vib}} + RT \quad (6)$$

where E_0 is the calculated total electronic energy, ZPE stands for zero-point energy, ΔH_{trans} , ΔH_{rot} and ΔH_{vib} are translational, rotational and vibrational contributions to the enthalpy. Finally, the RT term is added to convert the energy to enthalpy. ZPE was calculated to demonstrate the difference between harmonic computed frequencies and the actual anharmonic experimental frequencies.

In order to study the thermodynamic spontaneity, the Gibbs free enthalpies for the following reactions were computed:

All the values of the Gibbs enthalpies ΔG were computed in the standard state in the environments considered. Both electrostatic and nonelectrostatic (cavitation, repulsion and dispersion) terms were included in these values. The Gibbs enthalpies of the reactions (Figs. 2 and 12) were calculated as differences between the total gas-phase, aqueous-phase and ethanol-phase the Gibbs enthalpies of the products and substrates. All the values of this thermodynamic function were referred to the most energetically stable chemical forms. In these calculations $\Delta G(\text{OH}^-)$ was set to -75.771707 , -75.914631 and -75.910527 hartree for the gas phase, water and ethanol media, respectively, while $\Delta G(\text{H}_3\text{O}^+)$ was set to -76.715998 , -76.859623 and -76.855477 hartree for the gas phase, water and ethanol media, respectively. The optimised values of $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ are -76.454816 , -76.470024 and -76.469525 hartree in the gas phase, water and ethanol environments, respectively. These values are referred to fully optimised OH^- , H_3O^+ and H_2O with the use of the B3LYP/6-311+G(d,p) level of theory. The enthalpy of the proton in the gas phase is given by its translation energy, $H[\text{H}^+(g)] = 3/2 kT$. Its translation entropy in the gas phase is -32.43 kJ $\text{K}^{-1} \text{mol}^{-1}$, as calculated by the well-known Sackur-Tetrode equation, at 298 K and 1 atm. However, the value of the Gibbs free enthalpy of proton is $G[\text{H}^+(g)] = H[\text{H}^+(g)] - TS[\text{H}^+(g)] = -26.28$ kJ/mol. At last the aqueous-phase proton free enthalpy is given by the sum of $G[\text{H}^+(g)]$ and the hydration free enthalpy of the proton (-1104.5 kJ/mol), which was determined by Tissandier et al. [21].

The optimisation of the structure *trans*-resveratrol and the calculation of the antioxidation parameters in water and ethanol environments was performed by employing one of the most successful solvation models CPCM (conductor polarisable continuum model) for evaluation of chemical properties of the molecules in various solutions [19]. In this approach, the liquid is treated as a continuum characterised by a dielectric constant, which permits calculations of the solvation free enthalpy of the nonelectrostatic contributions and the electrostatic problem can be solved in the iterative way for very large chemical systems. Within the CPCM model, the effect of polarisation is represented numerically. In this model the effects of solvation are folded into the iterative SCF computation rather than making an extra step afterwards. Unfortunately, numerical gradients are prohibitively expensive owing to the fluctuations arising from the segmentation of the solvent accessible surface and the quality of the calculations depends on several factors. Moreover, this model permits the calculations of electronic properties that involve coupled-perturbed procedure, including all the solvent contributions. Of great importance is the proper use of the boundary conditions on the surface and a correct form of cavity. In our study the simple UAO model of cavity was employed to evaluate the aqueous and ethanol solvation effects. The CPCM calculations were performed with the tesserae of 0.2 \AA^2 average size. The solvent effect in the conformational equilibrium was assessed from the geometries fully optimised in the gas phase at their global energy minima. In the calculations dielectric constants of 24.55 and 78.39 for ethanol and water, respectively, were used.

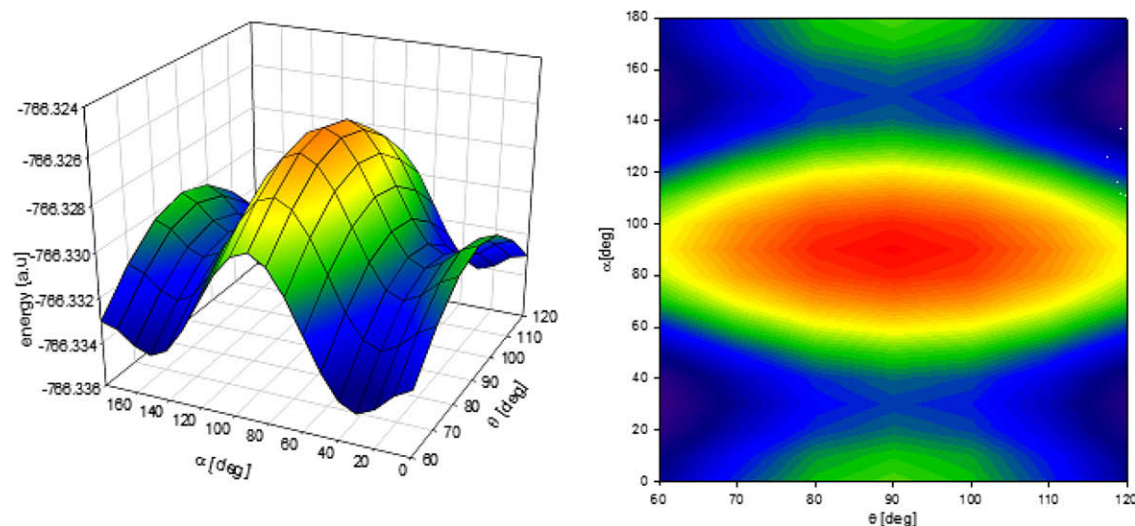


Fig. 3. The B3LYP/6-31G(d) conformational energy maps for *trans*-resveratrol in the gas phase along the α and θ coordinates.

3. Results and discussion

3.1. Ground state geometries of *trans*-resveratrol, and its 3-O-monoanion, 4'-O-monoanion, 3,4'-O-dianion, 3,5,4'-O-trianion, 3,5-O-dianion, cation radical and 4'-O-radical in the gas phase, water and ethanol environments. Thermodynamic analysis

After full optimisation in the gas phase, ethanol and water environment, *trans*-resveratrol and its 3-O-monoanion, 4'-O-monoanion, 3,4'-O-dianion, 3,5-O-dianion and 3,5,4'-O-trianion (Fig. 4) have been found in the global energy minimums, which is confirmed by the absence of the imaginary frequencies. The optimised values of the dihedral angles β ($C_6-C_1-O_4-H_4$), γ ($C_{10}-C_{11}-O_5-H_5$), φ ($C_{14}-C_{13}-O_3-H_3$) and δ ($C_{11}-C_{12}-O_4-H_4$) indicate that hydrogen atoms from all OH groups lie on the surface of *trans*-resveratrol, its 4'-O-radical, cation radical and anionic forms in the environments studied. The resonance forms of 4'-O-monoanion are planar in the gas phase (Fig. 6) and in water environment (Fig. 5). In both media they have the semi-quinone structure stabilised through the vinyl bond connecting the phenyl rings. A close inspection into the energies of these resonance forms reveals that they are almost isoenergetic in the gas phase and water medium thus they are characterised by similar energetical stability. The planar conformation of the anions strongly correlates with the antioxidative activity because it ensures the effective delocalisation of the lone electron pair in the phenyl rings.

From the optimised values of the α ($C_5-C_4-C_7-C_8$) and θ ($C_7-C_8-C_9-C_{10}$) dihedral angles at the B3LYP/6-311G(d,p) and B3LYP/6-311+G(d,p) levels it is evident that *trans*-resveratrol is strictly planar in the media studied. It must be pointed out that the strictly planar geometry of *trans*-resveratrol obtained determines the energetically favourable delocalisation of the π -electrons and the stacking interaction of the planar *trans*-resveratrol system may also facilitate electron transfer. Analysis of the total energies (Table 3) shows that in comparison with the gas phase the water and ethanol environments significantly reduce the total molecular energy of *trans*-resveratrol and its monoanions by about 26 and 68 kcal/mol, respectively. Thus, *trans*-resveratrol and its anions are more energetically stable in polar solvents than in the gas phase. Since the values of total energies of anionic forms in water and ethanol are very similar we can suggest that their energetical stabilities in these solvents are practically identical. It was found that all the anionic forms studied are less stable than neutral molecule in the environments considered. The results obtained reveal

also that 4',3-O-dianion is more energetically stable than 3,5-O-dianion in the environments studied. For example, in the gas phase the difference in the total energy between the 3,5-O-dianion and 4',3-O-dianion is 39.187 kcal/mol. It is probably due to higher resonance stabilisation of 4',3-O-dianion than 3,5-O-dianion. In addition, 4'-O-monoanion is the most stable in the environments studied in contrast to 3,5,4'-O-trianion which is the most unstable in these media. This result suggests that trianion of *trans*-resveratrol should be more reactive in contact with free radicals in real biological systems. Unfortunately, from the values of the Gibbs free enthalpies of the reactions of *trans*-resveratrol with water molecule it is clear that the abstraction of proton from this polyphenol by water molecule and as a result the formation of this trianion is highly thermodynamically unfavourable, while the formation of this 3,5,4'-O-trianion in the reaction of *trans*-resveratrol with OH^- anion is thermodynamically permitted (Table 5). It should be emphasised that in polar media ΔG of this reaction significantly decreases in comparison with the gas phase. Therefore, in polar solvents the formation of this trianion from neutral molecule of *trans*-resveratrol is highly thermodynamically preferable. This result suggests that in basic environments 3,5,4'-O-trianion will be formed and it will show high reactivity. Moreover, we observe that the difference in total energy between 3-O-monoanion and 4'-O-monoanion is much higher in the gas phase (by about 0.01 hartree) than in the polar environments (by about 0.003 hartree).

On the basis of analysis of the computed values of the Gibbs free enthalpies reactions examined (Table 5) we claim that the formation of all anions in the reactions of *trans*-resveratrol with water molecule is thermodynamically very unfavourable in the environments studied. Note that in the polar media studied the values of ΔG are significantly smaller than in the gas phase, hence it proves that polar environments facilitate proton abstraction from *trans*-resveratrol by water molecule. Comparing the values of ΔG we can conclude that the reactions studied are more thermodynamically preferable in water than in ethanol. Hence, the transfer of proton from *trans*-resveratrol to water molecule is particularly preferable in water medium. Moreover, on the basis of these results we claim that the formation of 4'-O-anion is more preferable than 3-O-monoanion, dianions and trianion in all the environments studied.

The calculated α ($C_5-C_4-C_7-C_8$) and θ ($C_7-C_8-C_9-C_{10}$) dihedral angles in 4'-O-radical (Fig. 7) and cation radical (Fig. 8) of *trans*-resveratrol indicate that these structures at the global energy minimum are strictly planar in the environments studied. Similarly to

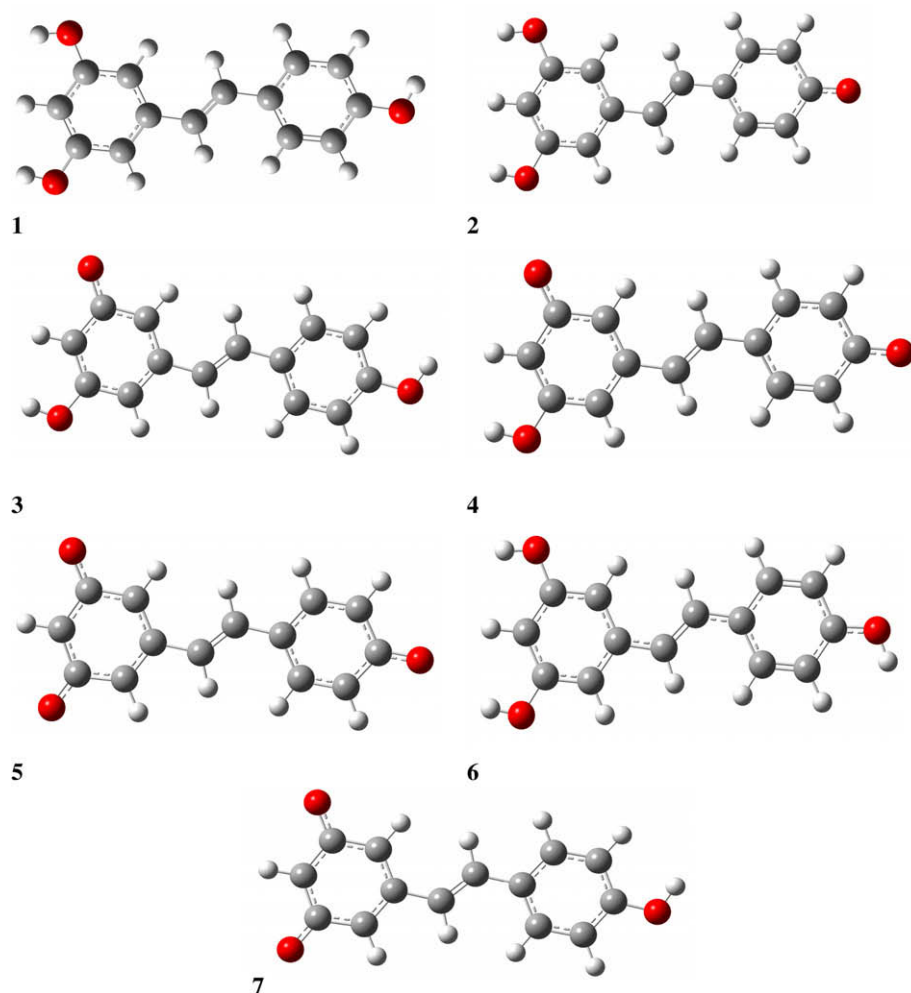


Fig. 4. The B3LYP/6-311+G(d,p) optimised in water environment structures of *trans*-resveratrol (1) and its 4'-O-monoanion (2), 3-O-monoanion (3), 4',3-O-dianion (4), 3,5,4'-trianion (5), cation radical (6) and 3,5-O-dianion (7).

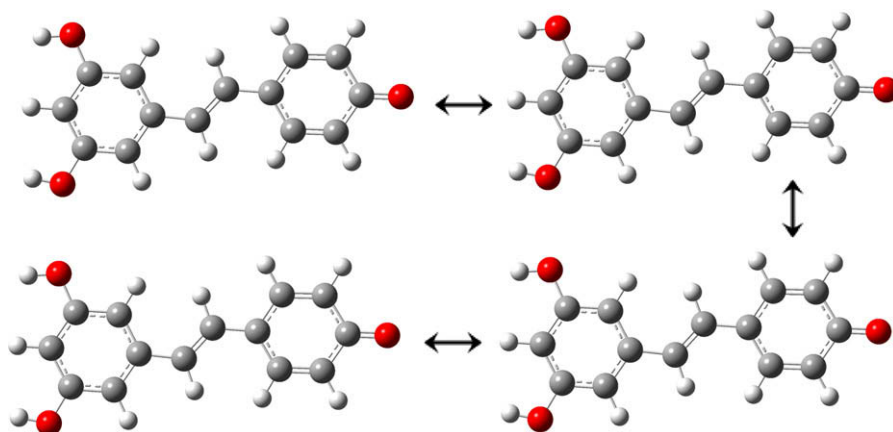


Fig. 5. The B3LYP/6-311+G(d,p) optimised resonance forms of *trans*-resveratrol 4'-O-monoanion in water environment.

the anions, this radical has semi-quinone geometry in which the unpaired electron is delocalised through both aromatic rings. The planar geometry of this radical and cation radical ensures the efficient interactions with the other free radicals in the real biological systems. Besides, the planar conformation and the presence of the vinyl bond in this radical form facilitate effective delocalisation of

the unpaired electron, which determines the energetic stability of these radicals and their resonance forms. Energy analysis reveals that 4'-O-radical is more stable in polar media studied than in the gas phase by about 2 kcal/mol. For instance, the differences in energy of 4'-O free radical in polar media and gas phase are smaller in comparison with the energy differences between the

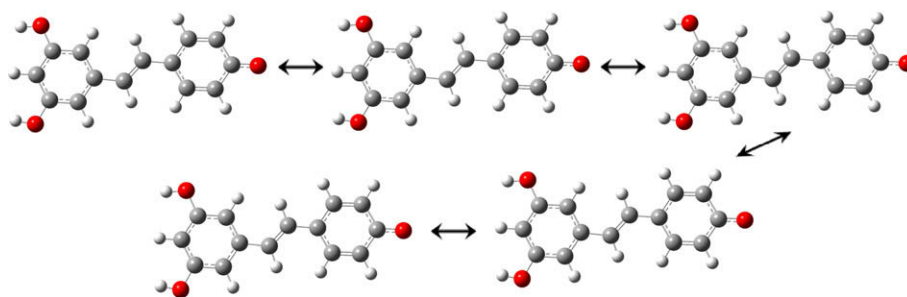


Fig. 6. The B3LYP/6-311+G(d,p) optimised resonance forms of *trans*-resveratrol 4'-O-monoanion in the gas phase.

Table 1

B3LYP/6-311G(d,p) calculated AIP [kcal/mol], BDE [kcal/mol] and at the B3LYP/6-311+G(d,p) level calculated PDE [kcal/mol] values.

Compound	Gas phase			Water medium			Ethanol medium		
	AIP	PDE	BDE	AIP	PDE	BDE	AIP	PDE	BDE
<i>Trans</i> -resveratrol	157.061 ^a	–	–	118.940 ^a	–	–	119.814	–	–
4'-O-H-bond	–	322.582	78.683 ^a	–	281.161	80.728 ^a	–	283.194	80.571
3-O-H bond	–	328.977	–	–	283.841	–	–	285.331	–

^a From Ref. [20].

Table 2

B3LYP/6-311+G(d,p) calculated the PDE [kcal/mol] values of the proton dissociation reactions of 4'-O-monoanion, 3,4'-O-dianion and 3,5-O-dianion in the gas phase, water and ethanol environments.

Reaction	Gas phase	Water	Ethanol
A	392.358	298.429	300.402
B	473.838	304.304	314.555
C	437.272	294.531	300.318

Table 3

B3LYP/6-311G(d,p) calculated the ΔG [kcal/mol] values of the reactions of 4'-O-monoanion, 3,4'-O-dianion and 3,5-O-dianion with water molecule and OH[–] anion in the gas phase, water and ethanol environments.

Reaction	Gas phase	Water	Ethanol
D	226.611	51.693	57.959
E	311.509	59.094	66.224
F	437.272	50.054	58.129
G	–38.151	–52.344	–50.628
H	8.617	–53.983	–50.459
I	46.749	–44.943	–42.364

Table 4

B3LYP/6-311G(d,p) computed the total molecular energy [hartree] of *trans*-resveratrol (a) and its 4'-O-radical and cation radical and B3LYP/6-311+G(d,p) computed total molecular energy of *trans*-resveratrol (b) and its anionic forms in the gas phase, water and ethanol media.

Chemical invidious	Gas phase	Water medium	Ethanol medium
<i>Trans</i> -resveratrol (a)	–766.5710456	–766.6134851	–766.6115014
<i>Trans</i> -resveratrol (b)	–766.5891652	–766.6329845	–766.6311403
4'-O-radical	–765.9348500	–765.9751190	–765.9733545
Cation radical	–766.3207522	–766.4239412	–766.61150140
4'-O-monoanion	–766.04468868	–766.1538933	–766.14952753
3-O-monoanion	–766.03460827	–766.1506138	–766.14621225
3,4'-O-dianion	–765.40784340	–765.66930406	–765.66082788
3,5,4'-O-trianion	–764.64084442	–765.17433399	–765.15800382
3,5-O-dianion	–765.34677336	–765.65761873	–765.64711559

anions. This result indicates that 4'-O-H bond is slightly sensitive to homolytic breakdown by free radicals in non-polar environ-

Table 5

The B3LYP/6-311+G(d,p) computed the Gibbs free enthalpies of the reactions presented in Fig. 2.

Reaction	Gas phase	Water medium	Ethanol medium
1	–87.108	–153.136	–150.752
2	169.059	48.188	50.828
3	174.581	48.153	52.574
4	395.684	99.881	108.788
5	433.803	108.924	116.883
6	707.200	158.978	175.012

ments than in polar media and that polar media stronger interact with charged chemical forms than with neutral. Moreover, in all environments we found that 4'-O-radical and cation radical was less stable than the neutral molecule. The results obtained prove that the difference in the total molecular energy between gas phase and polar environments is significantly greater for the cation radical. Since the cation radical is a charged chemical individual, the influence of polar medium on the total energy is higher. Therefore, it is expected that the single-electron transfer mechanism strongly depends on the presence of the polar environment and dominates in these environments. It is well known that the single-electron transfer and hydrogen-transfer mechanism must always occur in parallel, but at different rates. Moreover, the environments taken into regard in the quantum computations fundamentally differ from environment of reactions occurring in living organisms. Hence, the computational results allow only to partial explanation of the antioxidation mechanisms of *trans*-resveratrol activity.

3.2. Proton dissociation enthalphy

PDE is an important physical parameter to characterise the antioxidative properties of the compound investigated. This parameter characterises the ability of various polyphenolic antioxidants to proton donation in a polar medium. The molecules with lower values of the PDE are more susceptible to proton abstraction. Note that analysis of the SPLET mechanism shows that the second step is crucial to antioxidative action of *trans*-resveratrol. Hence, in this

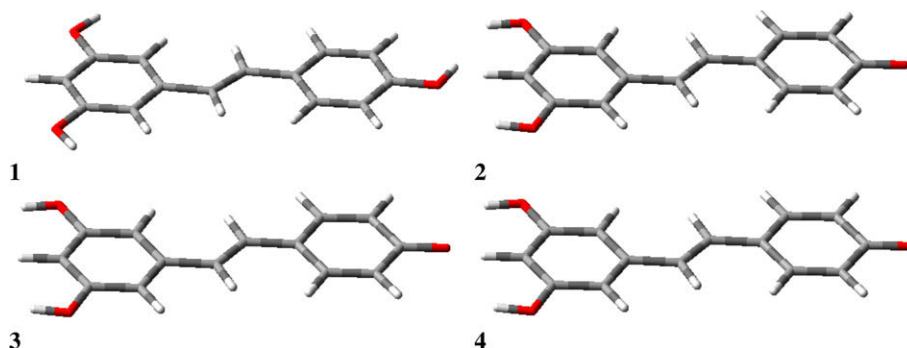


Fig. 7. The B3LYP/6-311G(d,p) optimised geometry of *trans*-resveratrol (1) in the gas phase and its 4'-O-radical in the gas phase (2), water environment (3) and ethanol environment (4).

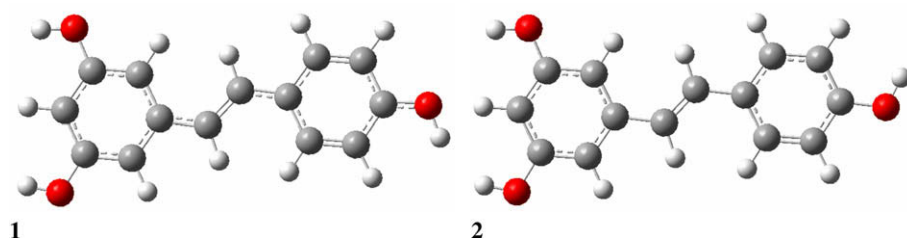


Fig. 8. The B3LYP/6-311G(d,p) optimised geometry of *trans*-resveratrol in ethanol environment (1) and its cation radical in this medium (2).

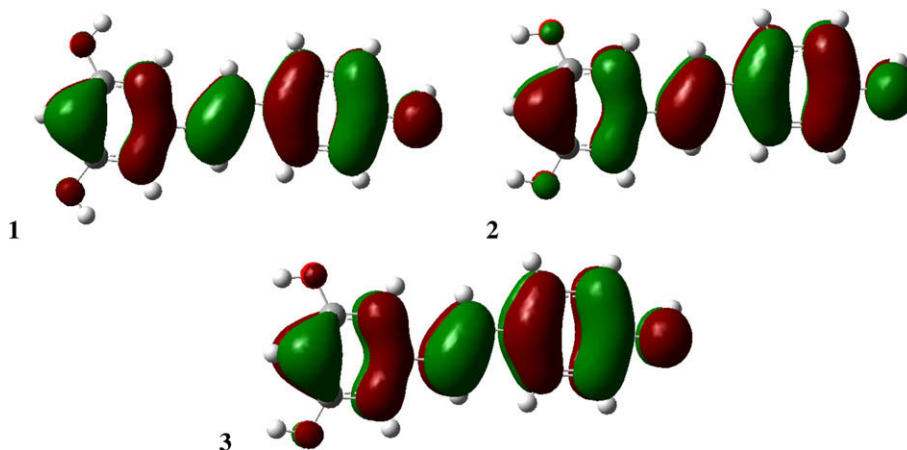


Fig. 9. The HOMO orbital distribution in *trans*-resveratrol in the gas phase (1), water (2) and ethanol environment (3).

mechanism the single-electron transfer dominates over proton transfer. The calculated PDE of 4'-O-H and 3-O-H bond for *trans*-resveratrol in water, ethanol medium and gas phase are presented in Table 1. Our results indicate that the PDE values of the 4'-hydroxyl bond in the environments examined are lower than those of the 3-hydroxyl group. Analysis of the PDE values in water and ethanol media shows that water as a strong polar compound is slightly more efficient proton donor than ethanol. As follows from our results, the 4'-OH group is more acidic than other hydroxyl groups. In this way we have confirmed the results obtained by Fukuhara et al. [12] who claimed that the 4-OH group of *trans*-resveratrol is the most reactive and determines its biological activity. Unfortunately, the high values of PDE in the environments investigated show that the ability of *trans*-resveratrol to donate proton is rather poor. Probably this property correlates highly with the acidity of *trans*-resveratrol. The value $pK_{a1} = 8.8$, $pK_{a2} = 9.8$, $pK_{a3} = 11.4$ for

the acidic dissociation constants of *trans*-resveratrol clearly indicates that this compound is a weak acid and its ion dissociation in solution is highly thermodynamically unfavourable [11]. It is expected that the mechanism proposed by Shang et al. [10] will not be dominant in the process of free radical scavenging. It should be emphasised that in a strongly basic environment in real biological systems these anions can be efficient antioxidants because in these environments *trans*-resveratrol occurs mainly in the anionic forms. This fact suggests that in intestinal juices *trans*-resveratrol reveals particularly strong antioxidant activity. Furthermore, when the solvent is included in the calculations, the analysis of PDE values reveals that in polar media *trans*-resveratrol is more able to proton donation than in the gas phase because the charge separation process is very sensitive to the polarity of solvents. This result proves that the antioxidant activity of *trans*-resveratrol strongly depends on the presence of polar solvents. PDE values of 3-O-H

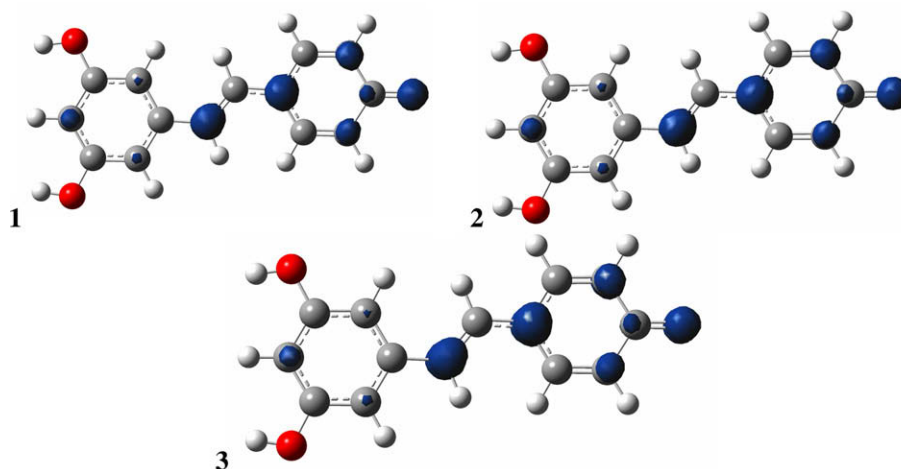


Fig. 10. The spin density distribution in 4'-O-radical of *trans*-resveratrol in water environment (1) ethanol environment (2) and the gas phase (3).

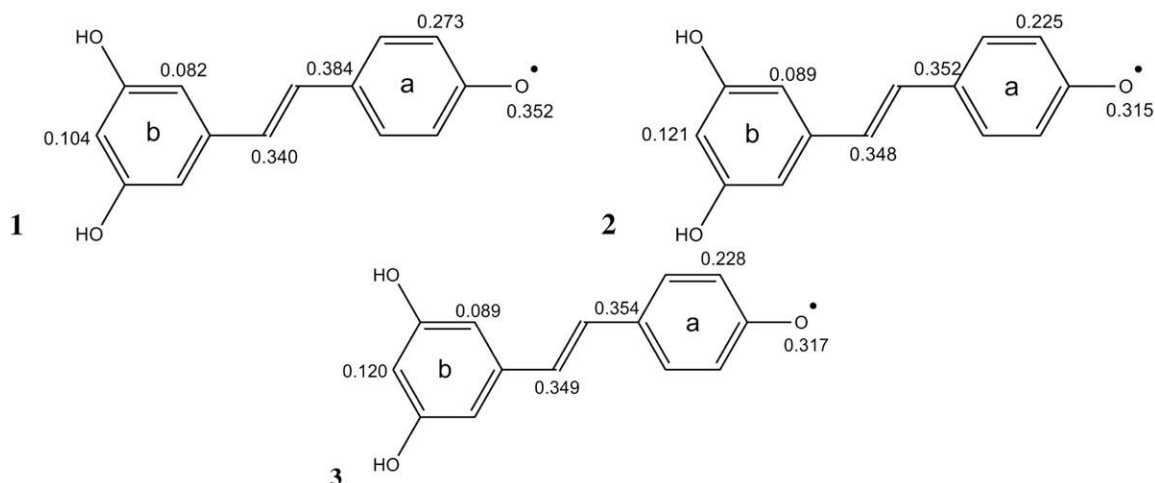


Fig. 11. The computed at uB3LYP/6-311G(d,p) level of theory spin density in the 4'-O-radical of *trans*-resveratrol in the gas phase (1), water environment (2) and ethanol environment (3).

bond in 4'-O-monoanion and of 5-O-H bond in 4',3-O-dianion in water environment imply that 4',3-O-dianion and 3,5-O-dianion are weaker donors of proton than 4'-O-monoanion (Table 2). Comparing the ability of these dianions to donate proton we see that 3,5-O-dianion is significantly more sensitive to proton donation than 4',3-O-dianion in the media studied and that the higher differences in the values of PDE are observed in the gas phase than in polar media.

Moreover, the computed values of the Gibbs free enthalpies of the reactions of the 4'-O-monoanion, 4',3-O-dianion and 3,5-O-dianion with water molecules (Fig. 12) indicate that these reactions are thermodynamically unfavourable in the media considered (Table 3), while the reaction of 4'-O-monoanion, 3,5-O-dianion and 4',3-O-dianion with OH^- is thermodynamically preferable in all the media studied, particularly in polar media. In our opinion the thermodynamic spontaneity of these reactions suggests that the 4'-O-monoanion can be active as antioxidant in basic media. It should be stressed that for the reactions of monoanions and dianions with H_2O in water medium the values of ΔG are significantly lower than in ethanol medium. This result proves that the transfer of proton from monoanions and dianions to OH^- is more preferable in water than in ethanol. Summarising, we can conclude that 4'-O-monoanions are more effective proton donors

than the dianions studied and that their antioxidative behaviour can be elucidated by the single-proton transfer mechanism. Besides, these findings prove that the formation of trianion in the reactions of 3,5-O-dianion and 4',3-O-dianion with water are thermodynamically unfavourable in the media studied.

3.3. Bond dissociation enthalpy, adiabatic ionisation potential, spin density and HOMO orbital distribution

The homolytic BDE of the hydroxyl bond is an important factor for determination of effectiveness of an antioxidant because the weaker this bond, the higher the antioxidative activity. Moreover, BDE is a thermodynamic parameter, which means that the weaker the bond, the more favourable the reaction with free radicals. However, the value of AIP represents the ease of the single-electron transfer which is one of the possible mechanisms by which an antioxidant can deactivate free radicals. Therefore, the molecules with low values of BDE and AIP are expected to show high antioxidant activity. The calculated values of BDE and AIP for the compound studied in the environments investigated are presented in Table 1. Our results clearly indicate that BDE of the 4'-O-H bond for *trans*-resveratrol and AIP are practically identical in ethanol and water environment. Hence, we can conclude that in these polar

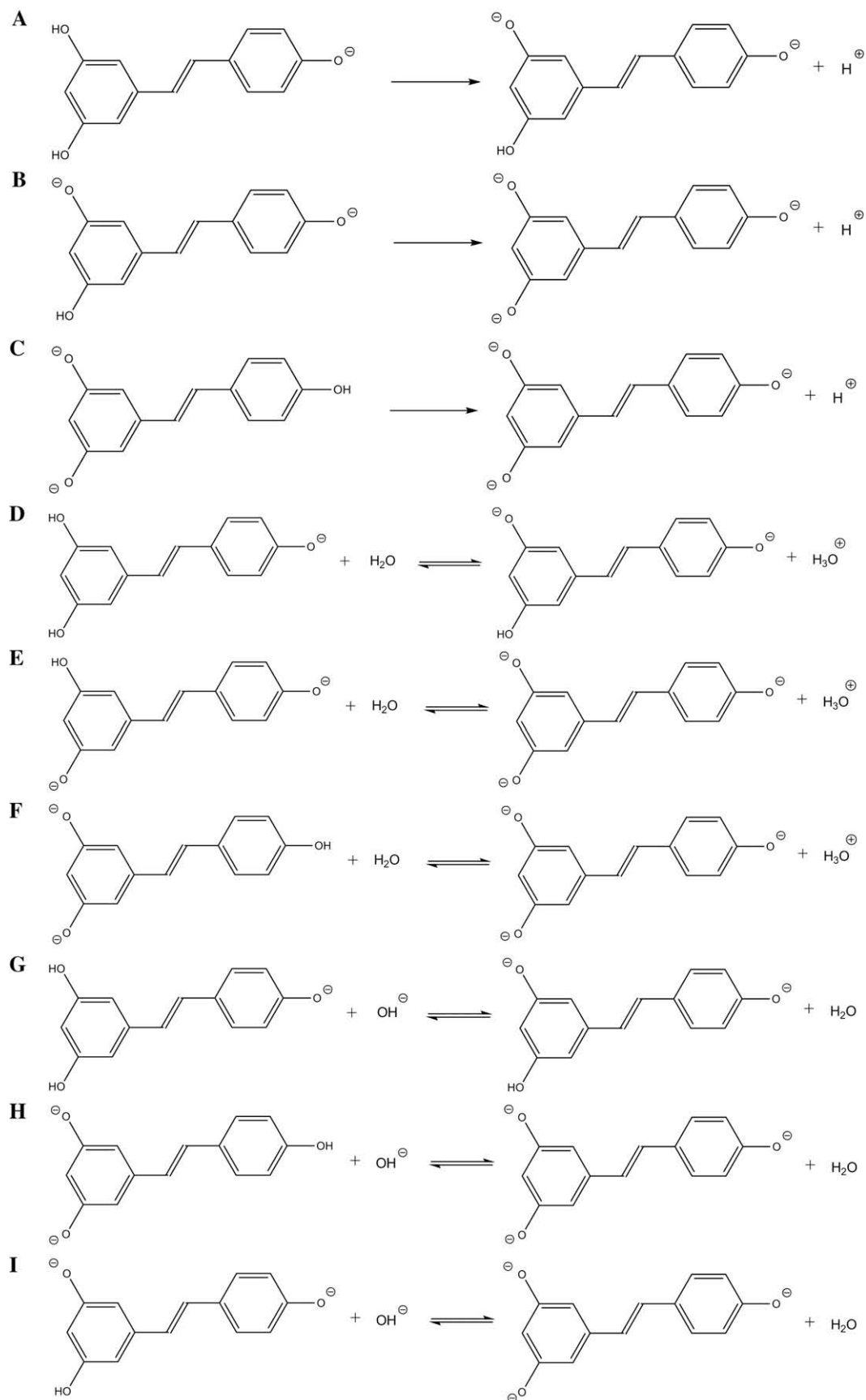


Fig. 12. The proton dissociation reactions of *trans*-resveratrol anions (A–C), the reactions of anions of *trans*-resveratrol with water molecule (D–F) and the reactions with OH^- anion (G–I).

environments the ability of *trans*-resveratrol to donate electron and hydrogen is very similar. Besides, note that in water and ethanol environment the AIP values increased by approximately 39 kcal/mol whereas in the values of BDE only a slight difference was found relative to the results for the gas phase. Note that the BDE values in water and ethanol are slightly higher than in the gas phase. This conclusion is supported by the fact that the BDE values are lower by about 2 kcal/mol in the gas phase than in polar media. This effect is strongly related to the higher stabilisation of *trans*-resveratrol by the polar environments studied. These findings suggest that in non-polar media *trans*-resveratrol can effectively scavenge the free radicals via the HAT mechanism and that polar solvents ensure better ability of *trans*-resveratrol to single-electron transfer than the gas phase. In addition, our findings reveal that the hydrogen atom transfer mechanism only weakly depends on the solvent while the single-electron transfer mechanism dominates in water and ethanol environments. Summarising we claim that the polar medium stronger interacts with charged cation radical, thus we observe great influence of polar medium on the values of AIP.

Free radical-scavenging activity of various phenolic antioxidants is also strictly related to the distribution of the HOMO orbital. The molecules with lower energy of the HOMO orbital have poorer electron donating ability. Besides, the electronic density distribution in these orbitals permits prediction of the most probable sites in the molecule investigated that can be easily attacked by free radicals and other reactive agents. Hence, molecular-electron donating ability is characterised by the highest occupied molecular orbital (HOMO) eigenvalues; the higher eigenvalues, the higher the antioxidant potency [22]. More active redox sites of *trans*-resveratrol are characterised by the high density of the HOMO orbital. Analysis of the HOMO orbital distribution (Fig. 9) shows that in all environments studied, it is delocalised on the whole molecule of *trans*-resveratrol and particularly on 4'-O-positions and the double bond that connects the phenyl rings. Hence, the 4'-OH group in *trans*-resveratrol can be easily attacked by the free radicals and other reactive agents in the real biological systems. We can conclude that the wide range of delocalisation of this orbital indicates that the compound investigated has many active redox sites. In contrast, the OH groups in *meta* position are insensitive to the interactions with free radicals. This observation for *trans*-resveratrol is in an excellent agreement with the results obtained by Cao et al. [9]. Furthermore, in the molecule studied the HOMO orbital is stretched along both phenyl rings. This finding is strongly correlated with the presence of the vinyl bond, which facilitates the distribution of HOMO orbital between two phenyl rings. The computed values of HOMO for *trans*-resveratrol at B3LYP/6-311+G(d,p) level in the gas phase, water and ethanol medium are -5.675 eV, -5.564 eV, -5.566 eV, respectively. As follows from these results, the HOMO eigenvalue in the gas phase is lower by about 2.5 kcal/mol than in polar media. These values indicate that this polyphenol is most effective antioxidant in water, since in this medium it is more susceptible to ionisation than in the other media. Hence, this result is in good agreement with the calculated values of AIP and proves that in polar environments *trans*-resveratrol can be more sensitive to the interaction with free radicals in biological systems via a single electron donation than in the gas phase and other non-polar media. It should be stressed that the practically identical values of the HOMO orbital eigenvalues in polar media do not allow a comparison of the electron donation ability of *trans*-resveratrol in water and ethanol.

Comparing the values of BDE and PDE (Table 1) in the environments studied, we observe that the values of PDE are higher than those of the other antioxidant factors. However, BDE values are smaller than those of AIP and PDE. Hence, we conclude that hydrogen atom transfer mechanism (HAT) for scavenging of free radicals

is the most favourable in the media studied, hence in physiological conditions the scavenging of harmful free radicals by *trans*-resveratrol can be achieved mainly via hydrogen donation. Significantly high values of PDE prove that the SPLET mechanism plays rather small role in the antioxidant process induced by this compound in living organisms. Despite this fact, in living cells *trans*-resveratrol can act as antioxidant according to the above-mentioned three mechanisms. On the basis of the values of the antioxidant factors obtained in the media studied we can conclude that the contribution of the mechanisms considered in the antioxidative activity depends strongly on the ability of the solvent to ionise *trans*-resveratrol. Therefore, our results contribute to elucidation of the conclusions given in [10].

Another molecular parameter correlated with the free radical-scavenging activity is the spin density, which was also calculated. Spin density characterises the distribution of electron spin in the free radicals and is responsible for the stability of these radicals. The high density of spin at any site of 4'-O-radical investigated strongly correlates with the reactivity of these sites. Analysis of the distribution of spin density for the 4'-O-radical of *trans*-resveratrol (Fig. 10) in the environments investigated shows a significantly higher concentration of spin density on the 4'-O-atom than on the other oxygen atoms. Furthermore, the high contribution to global spin density from vinyl bond leads to the conclusion that this fragment of 4'-O-radical can be also sensitive to the attack of reactive radical forms. Our results show that in the environments studied, the global contribution of the total spin density distribution from the phenyl ring (a) is significantly higher than the phenyl ring (b). Therefore, the spin density in the media studied is mainly delocalised through the phenyl ring (a). It is interesting to note that the polar environments decrease the spin density on 4'-oxygen in the comparison with the gas phase (Fig. 11). Additionally, in a polar media the contribution of phenyl ring (a) to global spin density is smaller than in the gas phase, while the contribution of phenyl ring (b) is higher than in the gas phase. Probably, this interesting finding follows from the interactions of polar media with the phenoxy radicals. The interactions of polar media with polar 3-OH and 5-OH group can contribute to this deformation of distribution of the spin density. Considering the fact that the lower the values of spin density, the higher energetic stability, the values of the spin density computed (Fig. 11) confirm higher stability of the 4'-O-radical in polar solvents than in the gas phase. The very low differences in spin density on 4'-O atom of 4'-O-phenoxy radical in water and ethanol media are correlated with very low differences in the molecular energies in these solvents (Table 4). Comparing the spin density distributions presented in the Figs. 10 and 11, we observe that these distributions are in agreement because in both figures we can see that this density is mainly distributed on the phenyl ring (a). However, the differences in the spin density values on the atoms from phenyl ring (b) are very small.

4. Conclusions

The computations performed by the DFT method revealed that *trans*-resveratrol is more effective donor of hydrogen atom in the gas phase than in the polar media considered. It has been shown that in water and ethanol media the antioxidative activity of *trans*-resveratrol is very similar. As follows from our results, *trans*-resveratrol antioxidative activity is realised mainly according to the HAT mechanism and that SPLET as well as ET-PT mechanisms have the smaller contribution to free radical-scavenging activity of *trans*-resveratrol. The results obtained demonstrate that *trans*-resveratrol is more able to donor electron and proton in polar media than in gas phase. It was shown that the ability of *trans*-resveratrol to donate proton is thermodynamically unfavourable in

the media considered. The most stable conformations of *trans*-resveratrol and its 3-O-monoanions, 4'-O-monoanion, 3,4'-O-dianion, 3,5-O-dianion, 3,5,4'-O-trianion, cation radical and 4'-O-radical are strictly planar in the environments studied. Our study has demonstrated that the transfer of proton from *trans*-resveratrol to water molecule is thermodynamically unfavourable in the media studied. The geometry of the anion forms ensures the favourable delocalisation of the lone electron pair in phenyl rings and proton donation in the neutral molecule. However, the planar geometry of 4'-O-phenoxyl radical and cation radical determines the most energetically favourable delocalisation of the unpaired electron. Our study has shown that 4'-O-monoanions are more able to donate proton than the dianions studied and it suggests that this 4'-O-monoanion can be a scavenger of free radicals in basic media. It is found that the strong antioxidative activity of *trans*-resveratrol can be related also to the semi-quinone structure of anions and 4'-O-radical, stabilised by the presence of the vinyl bond and the resonance. To sum up, our study contributes to better understanding of the strong antioxidative activity of *trans*-resveratrol.

Acknowledgements

This study is supported by Supercomputer Center in Poznań grant "The investigations of the biophysicochemical properties of *trans*-resveratrol". The authors are very indebted to Professor Jerzy Konarski and Rafał Górniak for many helpful and stimulating discussions and to Msc Maria Szychalska and Ph.D. Piotr Stępień for linguistic assistance.

References

- [1] Y.-J. Cai, J.-G. Fang, L.-P. Ma, L. Yang, Z.-L. Liu, *Biochem. Biophys. Acta* 1637 (2003) 31.
- [2] Y.-J. Surh, J.-Y. Hurh, E. Lee, G. Kong, S. Lee, *Cancer Lett.* 140 (1999) 1.
- [3] M. Murias, W. Jäger, N. Handler, T. Erker, Z. Horvath, T. Szekeres, H. Nohl, L. Gille, *Biochem. Pharm.* 69 (2005) 903.
- [4] A. Matsuoaka, K. Takeshita, A. Furata, M. Ozaki, A. Fukuhara, N. Miyata, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 521 (2002) 29.
- [5] L.A. Stivala, M. Savio, F. Carafoli, P. Perucca, L. Bianchi, G. Maga, L. Forti, U.M. Pagnoni, A. Albini, E. Prosperi, V. Vannini, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 22586.
- [6] A.N. Queiroz, A.Q. Bruno, M.W. Moraes Jr., Rosivaldo S. Borges, *Eur. J. Med. Chem.* 30 (2008) 1.
- [7] J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1173.
- [8] F. Caruso, J. Tanski, A. Villagas-Estrada, M. Rossi, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7279.
- [9] H. Cao, X. Pan, C. Li, C. Zhou, F. Deng, T. Li, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 1869.
- [10] Y.-J. Shang, Y.-P. Qian, X.-D. Liu, F. Dai, X.-L. Shang, W.-Q. Jia, Q. Liu, J.-G. Fang, B. Zhou, *J. Org. Chem.* 74 (2009) 5025.
- [11] J.M. López-Nicolas, F. García-Carmona, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 7600.
- [12] K. Fukuhara, M. Nagakawa, I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Imai, S. Urano, S. Fukuzumi, T. Ozawa, N. Ikota, M. Mochizuki, N. Miyata, H. Okuda, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 1437.
- [13] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Menucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian 03, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2003.
- [14] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785.
- [15] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648.
- [16] C. Peng, P.Y. Ayala, H.B. Schlegel, M.J. Frisch, *J. Comp. Chem.* 17 (1996) 49.
- [17] A.P. Scott, L. Radom, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 16502.
- [18] L.A. Sivala, M. Savio, F. Carafoli, P. Perucca, L. Bianchi, G. Maga, L. Forti, U.M. Pagnoni, A. Albini, E. Prosperi, V. Vannini, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 22586.
- [19] A. Klamt, G. Schürmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1993) 799.
- [20] D. Mikulski, R. Górniak, M. Molski, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1015.
- [21] M.D. Tissandier, K.A. Cowen, W.Y. Feng, E. Gundlach, M.H. Cohen, A.D. Earhart, J.V. Coe, T.R. Tuttle, *J. Phys. Chem. A* 102 (1998) 7787.
- [22] M. Nsangou, Z. Dhaouadi, N. Jäidane, Z. Ben Lakhdar, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* 850 (2008) 135.
- [23] M.M. Bisarro, B.J.C. Cabral, R.M.B. dos Santos, J.A.M. Simões, *Pure Appl. Chem.* 71 (1999) 1249.
- [24] W.D. Parker, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 7458.



Quantum chemistry study of interaction of Cu^{2+} cation and aqua-copper $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_{1-4}]^{2+}$ complexes with resveratrol stereoisomers, phospholipid and deoxythymidine 5'-monophosphate

Damian Mikulski *, Marcin Molski

Department of Theoretical Chemistry, Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 January 2010

Received in revised form 12 May 2010

Accepted 25 June 2010

Available online 23 July 2010

Keywords:

trans-Resveratrol

cis-Resveratrol

trans-Resveratrol–Cu(II) complexes

Phospholipid

Deoxythymidine 5'-monophosphate

DFT method

ABSTRACT

The accurate quantum-chemical computations based on DFT, Hartree–Fock and second-order Møller–Plesset (MP2) methods have been performed for the first time to study the interaction of the Cu^{2+} ion and $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_{1-4}]^{2+}$ complexes with *trans*-resveratrol, its *cis*-stereoisomer, phospholipid and deoxythymidine 5'-monophosphate in vacuum and water medium. On the basis of the interaction energies we have demonstrated that O3 and O5 oxygen atoms of the stereoisomers of resveratrol form the most stable chelate complexes with Cu^{2+} . It has been shown that the capacity of *trans*-resveratrol to chelate Cu^{2+} is higher than that of *cis*-resveratrol. The *trans*-resveratrol– Cu^{2+} –phospholipid [*trans*-resveratrol– $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4$ –phospholipid] $^{2+}$, *trans*-resveratrol– Cu^{2+} –deoxythymidine 5'-monophosphate and [*trans*-resveratrol– $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4$ –deoxythymidine 5'-monophosphate] $^{2+}$ systems in which Cu^{2+} and $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ aqua complex coordinate to the negatively charged oxygen atoms of 5'-monophosphate group of deoxythymidine 5'-monophosphate and phospholipid are characterised by the lowest interaction energy. We have proved that the hydration of the Cu(II) ion by four water molecules contributes to the dramatic reduction of the energetical stability of all the complexes studied. It was pointed out that in aqueous medium the stability of all complexes is significantly higher than in vacuum. The result suggests that *trans*-resveratrol–Cu(II) and [*trans*-resveratrol– $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ complexes can bind with negatively charged oxygen atoms of 5'-monophosphate anion of phospholipids which form a polar shell surrounding LDL particles. Furthermore, it has been found that *trans*-resveratrol–3-O–Cu(II) and *trans*-resveratrol–5-O–Cu(II) complexes are capable of forming the most stable complexes with deoxythymidine 5'-monophosphate and phospholipid. The findings obtained satisfactorily explain the experimental data and give insight into understanding of therapeutic and biological activity of *trans*-resveratrol– Cu^{2+} complexes.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

trans-Resveratrol (*trans*-4',3,5-trihydroxystilbene, Fig. 1) is a common natural phytoalexin that can be found in a wide variety of plants including grapes, mulberries and peanuts. It is also present in red wines. This compound is known to show anti-inflammatory [1], anti-platelet [2], anti-mutagenic [3] and antioxidant [4] effects. *trans*-Resveratrol has been identified also as an anti-cancer agent capable of inhibition of the three major stages of carcinogenesis, i.e. initiation, promotion as well as progression [5]. Additionally, it shows inhibitory effect in the interactions with xanthine oxidase [6], cyclooxygenase COX-1 [7], ribonucleotide reductase [8] and DNA polymerase [9]. The study by Frankel et al. [10] has revealed that *trans*-resveratrol is an effective inhibitor of LDL (low-density lipoprotein) peroxidative degradation. Further,

Belguendouz et al. [11] have pointed out that the effect reported by Frankel et al. [10] can be connected with the chelation of copper ions (II). Hence, the *trans*-resveratrol–Cu(II) complexes prevent blood vessel membranes from being affected by the harmful action of the peroxidised LDL. Moreover, these authors claim that isomerization of *trans*-resveratrol into *cis*-stereoisomer (Fig. 1) significantly lowers the ability to chelate the copper ion (II).

Over the last few years many experimental studies have provided interesting insight into the capability of *trans*-resveratrol and its dimer to induce oxidative DNA damage in the presence of certain transition metal ions, especially copper ions (II). A significant contribution to the elucidation of this biochemical process was brought by Fukuhara and Miyata [12]. They have shown for the first time that *trans*-resveratrol and its complex with Cu(II) have high ability to bind with plasmid DNA strand. Also, Fukuhara et al. [13] using a supercoiled DNA have analyzed the ability of *trans*-resveratrol and its analogues to induce DNA-cleavage. On the basis of fluorescence emission study, these authors suggest

* Corresponding author. Tel.: +48 0607608785; fax: +48 618291505.

E-mail address: dmkwant@amu.edu.pl (D. Mikulski).

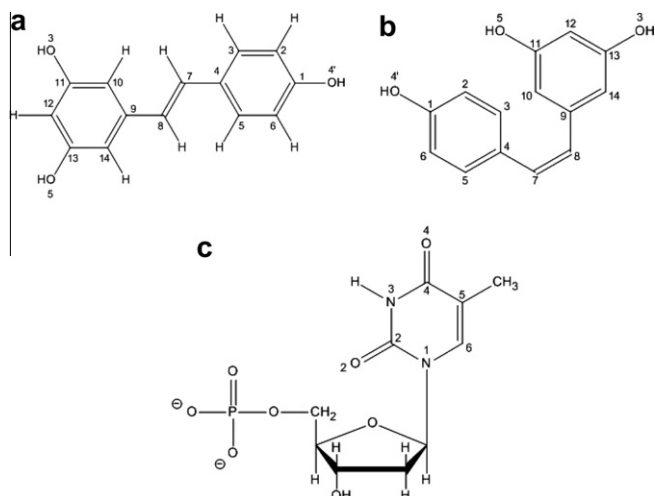


Fig. 1. Molecular structures of *trans*-resveratrol (a), *cis*-resveratrol (b) and dianion of deoxythymidine 5'-monophosphate (c).

that *trans*-resveratrol binds to duplex DNA through significant intercalation while on the basis of UV absorption spectra they prove that *trans*-resveratrol makes 1:1 complexes with Cu^{2+} . The authors also claim that the 4'-OH group is essential for Cu(II) coordination and the ability of this group to bind with copper ion strongly depends on the structure of *trans*-stilbene derivative. Recently, Azmi et al. [14] have investigated *trans*-resveratrol- Cu^{2+} induced DNA-breakage in human peripheral blood. Their results have confirmed that the complexes of *trans*-resveratrol with Cu(II) are strongly capable of DNA degradation in the lymphocyte cells.

To understand the role of the *trans*-resveratrol-Cu(II) complexes in the process of DNA-cleavage and inhibition of LDL peroxidation, it is first of all necessary to carry out a detailed interaction study of these complexes with 5'-monophosphate deoxyribonucleotide and phospholipid. Additionally, the above-mentioned biomedical activity of the *trans*-resveratrol- Cu^{2+} and *cis*-resveratrol- Cu^{2+} complexed systems have motivated us to perform quantum-chemical computations to characterise the interaction of *trans*-resveratrol and its *cis*-stereoisomer with Cu(II) and to determine the most reliable geometry of these complexes. Since the hydrophobic core of LDL particles is surrounded by a shell of phospholipids, the most stable geometry of *trans*-resveratrol-Cu(II)-phospholipid complex has been determined. The main purpose of this study was to elucidate theoretically the interactions of *trans*-resveratrol-Cu(II) complex with dianion of phospholipid. In order to explain the interaction of *trans*-resveratrol- Cu^{2+} complex with DNA in cancer cells, *trans*-resveratrol- Cu^{2+} -deoxythymidine 5'-monophosphate complex was investigated. In all computations we used the DFT method as it is very useful for studying metal cation-biomolecule interactions.

Considering the fact that in real biological systems water molecules are coordinated to Cu(II), we studied the interactions of the Cu^{2+} cation with resveratrol stereoisomers, deoxythymidine 5'-monophosphate and phospholipid in the presence of several water molecules which were placed in neighbourhood of Cu^{2+} . Furthermore, the important studies by Burda et al. [15,16] have motivated us to develop a theoretical model of aqua-Cu(II) complexes interactions with stereoisomers of resveratrol, phospholipid and deoxythymidine 5'-monophosphate. Hence, *ab initio* MP2 and DFT methods were used to demonstrate the high influence of these molecules on the stability and geometry of the complexed systems examined. Moreover, to investigate the influence of water medium on the stability of the complexes, the computations were performed for this medium. In this way, the interaction model pre-

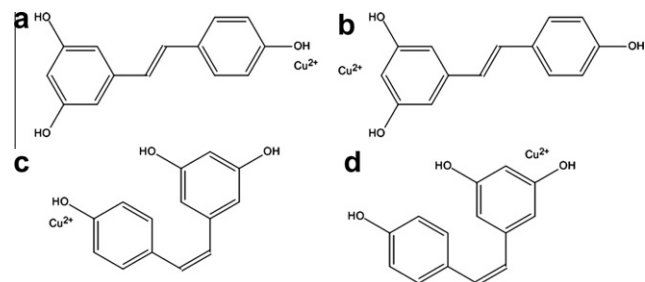


Fig. 2. Molecular structures of *trans*-resveratrol- Cu^{2+} (a and b) and *cis*-resveratrol- Cu^{2+} (c and d) complexes.

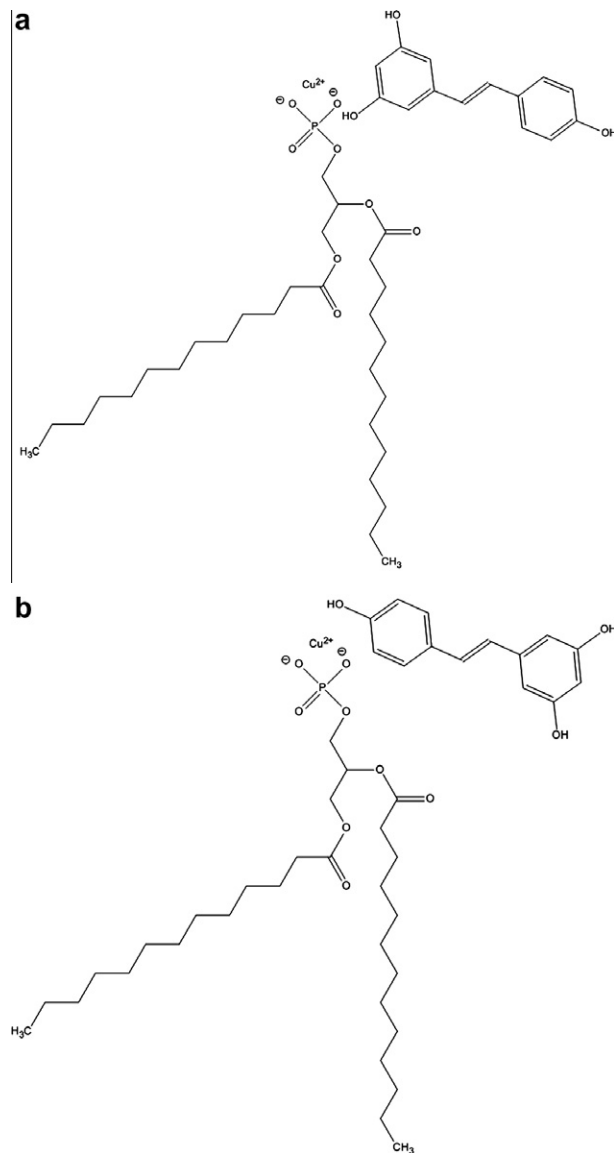


Fig. 3. Molecular structures of *trans*-resveratrol- Cu^{2+} -phospholipid complexes.

sented is more adapted for real biological processes occurring in cells of living organisms.

2. Computations

All quantum-chemical computations were carried out with the use of GAUSSIAN 03W computational package [17]. The geometries of each neutral compound and complexes with Cu^{2+} were fully

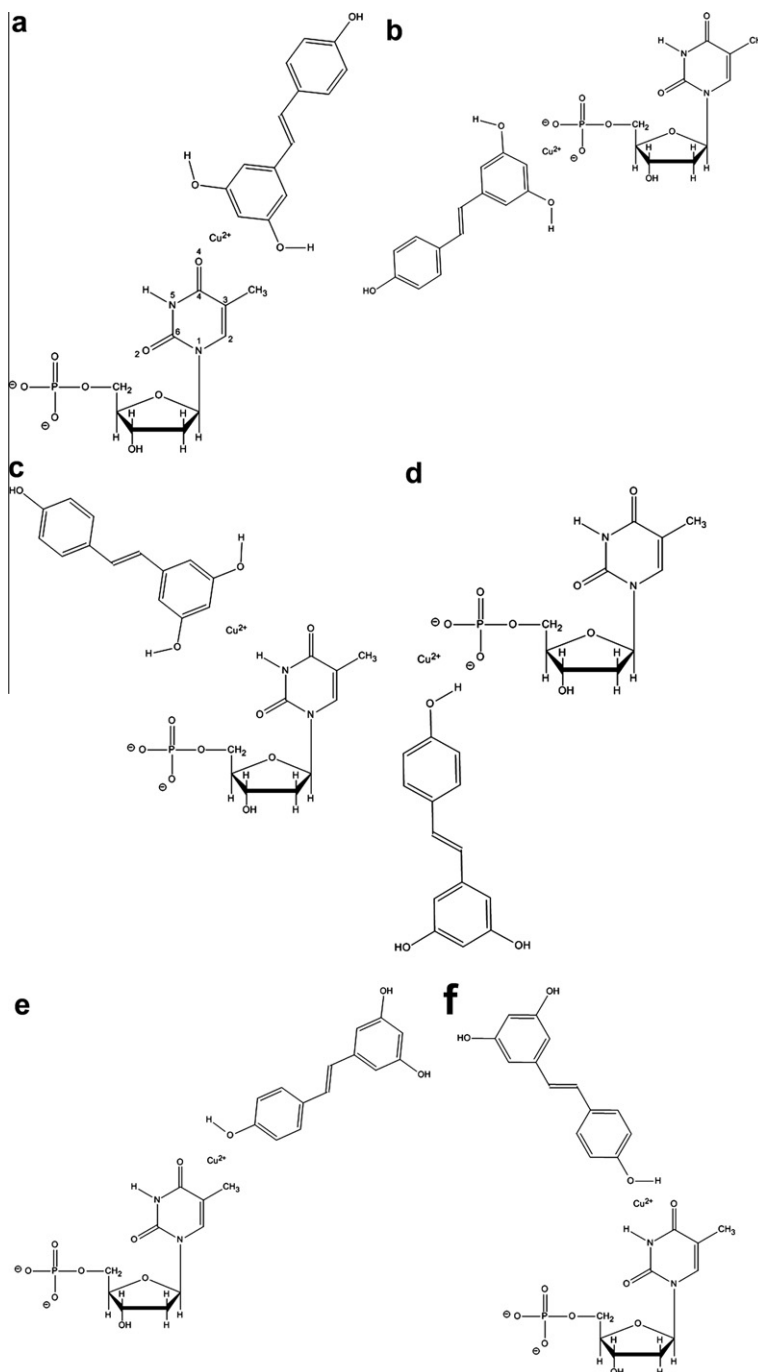


Fig. 4. Molecular structures of *trans*-resveratrol- Cu^{2+} -deoxythymidine 5'-monophosphate complexes.

optimised in the ground electronic state, in vacuum and water medium. Full optimization of each structure was performed without symmetry constraints. Computations were performed for *trans*-resveratrol- $\text{Cu}(\text{II})$ and *cis*-resveratrol- $\text{Cu}(\text{II})$ complexes corresponding to the positions known as the potential coordination sites for the interaction of Cu^{2+} with resveratrol stereoisomers (Fig. 2). In *trans*-resveratrol- Cu^{2+} -phospholipid complex the Cu^{2+} ion was coordinated to 4'-O and 3-O atom of *trans*-resveratrol (Fig. 3) while in *trans*-resveratrol- Cu^{2+} -deoxythymidine 5'-monophosphate this ion was bound to the N1, N3, O2 and O4 atoms of deoxythymidine and to negatively charged oxygen atoms of 5'-monophosphate group (Fig. 4). We studied the interactions of *trans*-resveratrol-4'-O- $\text{Cu}(\text{II})$ and *trans*-resveratrol-3-O- $\text{Cu}(\text{II})$

complexes with deoxythymidine 5'-monophosphate. All geometries of the complexes including Cu^{2+} were fully optimised employing Becke's three-parameter hybrid functional B3LYP with the gradient-corrected correlation functional by Lee, Yang and Parr [18] combined with the LANL2DZ functional base including effective core potentials (ECP) used to include some relativistic effects for heavy transition metals. Finally, for the fully optimised geometry of all chemical systems, the single-point calculations of the correlation energy were performed with use of the full second-order Møller-Plesset perturbation method and the 6-311+G(d,p) basis set. Considering the fact that the contribution of the correlation energy to the total interaction energy of the complexes studied is very important, we used the MP2 method in our computations.

For the full geometry optimization, several types of aqua complexes were used (Figs. 8–10). In particular, the complexes with the copper ion (II) surrounded by one, two, three and four water molecules were considered. In order to compare their relative stabilities in the media studied for all optimised structures of aqua complexes in their global energy minima, the electronic energy using MP2(full)/6-311+G(d,p) level was computed. The molecular geometry of all aqua complexes were in the first step optimised at the B3LYP/6-31+G(d,p) and further these geometries were fully reoptimised with the use of the B3LYP/LANL2DZ level of theory.

The most stable conformations obtained from the potential energy surface scans were used for full optimization. The potential energy surface scans were made to determine the starting geometry of the chemical systems examined and the approximate the location of the energy minimum structures. Specifically, rotational potential profiles were obtained by scanning several dihedral angles using B3LYP/6-31G(d) level of theory. They allowed us to gather information about the following structural features: (i) orientation of the hydroxyl groups in relation to the phenyl rings; (ii) orientation of the phenyl rings in relation to the vinyl bond [α ($C_5-C_4-C_7-C_8$) and θ ($C_7-C_8-C_9-C_{10}$)] of *trans*-stilbene skeleton.

For complexes treated as open-shell systems the most reliable Restricted Open Shell (ROS) approach was applied. The atomic charge distribution was obtained with the use of the full Mulliken population analysis. *trans*-Resveratrol and its *cis*-stereoisomer were fully optimised with the use of the sufficiently large 6-311++G(3df,2pd) basis set which puts diffuse, 3d and 3f polarization functions on hydrogen and heavy atoms. The geometry of the *trans*-resveratrol–Cu²⁺–phospholipid complex was optimised at the first step with the use of the HF/6-31+G(d) level while the optimization of dianion of phospholipid was performed at B3LYP/6-31+G(d,p) level. Next, the geometry of *trans*-resveratrol–Cu²⁺–phospholipid complex obtained at HF/6-31+G(d) level was fully optimised using B3LYP/LANL2DZ level. We used phospholipid which is the ester of glycerin, phosphoric (V) acid and *n*-tridecane fatty acid. The geometry of dianion of deoxythymidine 5'-monophosphate was optimised using B3LYP/6-311+G(d,p) level. For all fully optimised structures the harmonic vibrational frequencies and zero-point energy corrections were computed analytically and scaled by a factor 0.973 as recommended.

The interaction energies ΔE_{stab} were computed as the differences in the electronic energies of the complexed systems and the electronic energies of the isolated chemical systems. These interaction energies are useful parameters permitting the evaluation of stability of the complexes investigated. The zero-point vibrational energy corrections (ZPVE) to the computed ΔE_{stab} were applied. Hence, the interaction energies with ZPVE correction were estimated using the following equation:

$$\Delta E_{\text{stab(ZPVE)}} = E_{\text{complex(ZPVE)}} - (E_A(\text{ZPVE}) + E_B(\text{ZPVE})), \quad (1)$$

where $E_{\text{complex(ZPVE)}}$, $E_A(\text{ZPVE})$ and $E_B(\text{ZPVE})$ are the sum of electronic and zero-point energies of complexes and monomers. In general, the influence of basis set superposition error (BSSE) [19] on the values of the binding energies is very small. Nevertheless, throughout this study the binding energies values were corrected for the BSSE estimate. The BSSE was evaluated using the counterpoise correction scheme (CP-correction) [20]. The interaction energies with this correction were computed from the following relationship:

$$\Delta E_{\text{stab(BSSE)}} = E_{\text{complex}} - (E_{A(\text{complex})} + E_{B(\text{complex})}), \quad (2)$$

where E_A and E_B represent the electronic energies of monomers for their geometries in the complexes, computed using the basis function in which these complexes were fully optimised. However, the interaction energies were calculated for all complexes using the energy difference between the complexes and their components:

$$\Delta E_{\text{stab}} = E_{\text{complex}} - (E_A + E_B), \quad (3)$$

where E_{complex} , E_A and E_B represent the electronic energies of complexes, its component A and B, respectively.

Since the interaction between metal cations and various biomolecules strongly depends on polar solvent in the real biological systems, solvation effect was taken into account in this study. The solvent effects were computed by using the polarizable conductor solvation model (C-PCM) [21] as implemented in the Gaussian 03W program. In this model water is assumed as a macroscopic continuum characterised a dielectric constant $\epsilon = 78.39$. The UAO solvent cavity model was used in the computations. The C-PCM computations were performed with tesserae of 0.2 Å² average size. We investigated the influence of water environment on the stability and geometry of the complexes investigated. The solvent effects in the conformational equilibrium were obtained for the optimised most energetically stable geometries of resveratrol stereoisomers and complexes in vacuum.

3. Results and discussion

3.1. The optimised geometries of resveratrol stereoisomers, their complexes and aqua complexes with Cu(II)

Geometrical parameters of the fully optimised structures of *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol (Fig. 5) by using B3LYP/6-311++G(3df,2pd) level in vacuum are displayed in Table 4. The optimisation of all the chemical systems studied leads to the energy minimum on the potential energy surface, whose presence is confirmed by the lack of imaginary frequencies. The optimised values of bond lengths of *trans*-resveratrol are in satisfactory consistency with the available X-ray experimental data [22]. The calculated values of O–H bonds are slightly shorter for *cis*-resveratrol than its *trans*-stereoisomer, hence in *cis*-resveratrol these bonds are more stable. The optimised values of the dihedral angles β ($C_6-C_1-O_4-H_4$), γ ($C_{10}-C_{11}-O_5-H_5$) and ϕ ($C_{14}-C_{13}-O_3-H_3$) indicate that the hydrogen atoms from OH groups lie in the surface of phenyl rings of resveratrol

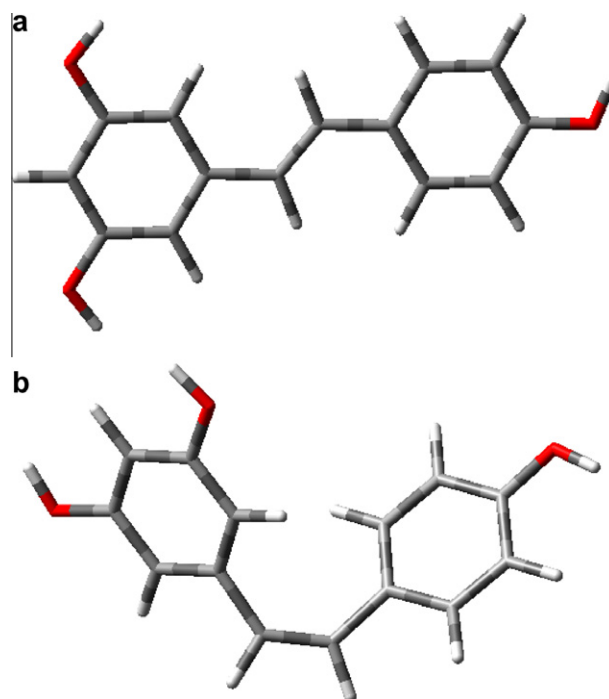


Fig. 5. The fully optimised geometries of *trans*-resveratrol (a) and *cis*-resveratrol (b) at the B3LYP/6-311++G(3df,2pd) level.

stereoisomers in vacuum and water medium. The dihedral angles α ($C_5-C_4-C_7-C_8$) and θ ($C_7-C_8-C_9-C_{10}$) of *trans*-resveratrol are practically equal to zero in both media studied, while the optimised geometry of *cis*-resveratrol is characterised by significantly high values of dihedral angles α and θ . Therefore, *trans*-resveratrol is a planar molecule, whereas its *cis*-stereoisomer significantly deviates from planarity. This result is in excellent agreement with our previous result obtained using the B3LYP/6-311G(d,p) and B3LYP/6-311+G(d,p) levels [23–25]. Note that the findings obtained for *trans*-resveratrol are in unsatisfactory agreement with the data presented in the paper [22]. In our opinion the crystalline and isolated structures of the molecule investigated can substantially differ from each other because their molecular environments are different. In particular, the packing effect dominant in the crystal form is mainly responsible for the deviation from planarity of *trans*-resveratrol. The

energy analysis reveals that *trans*-resveratrol is more stable than its *cis*-stereoisomer. The difference between total energies of these stereoisomers is equal about 6.3 kcal/mol. Probably due to strong deviation from planarity, *cis*-resveratrol is characterised by higher value of total energy.

The computations reveal that in all the most stable geometries of *trans*-resveratrol–Cu(II) (Fig. 6), *trans*-resveratrol–Cu²⁺–phospholipid (Figs. 3a and 6c), *trans*-resveratrol–Cu²⁺–deoxythymidine 5'-monophosphate complexes (Figs. 4b and 6g) and all aqua complexes the *trans*-stilbene moiety is planar in the global energetic minimum, while in *cis*-resveratrol–Cu(II) complex this moiety is characterised by a significant deviation from planarity. The optimised values of Cu–O3 and Cu–O5 bonds in the most stable geometry of *trans*-resveratrol–Cu²⁺ (Fig. 6a) are 1.96 and 5.42 Å, respectively, and in *cis*-resveratrol–Cu²⁺ (Fig. 6b) complex

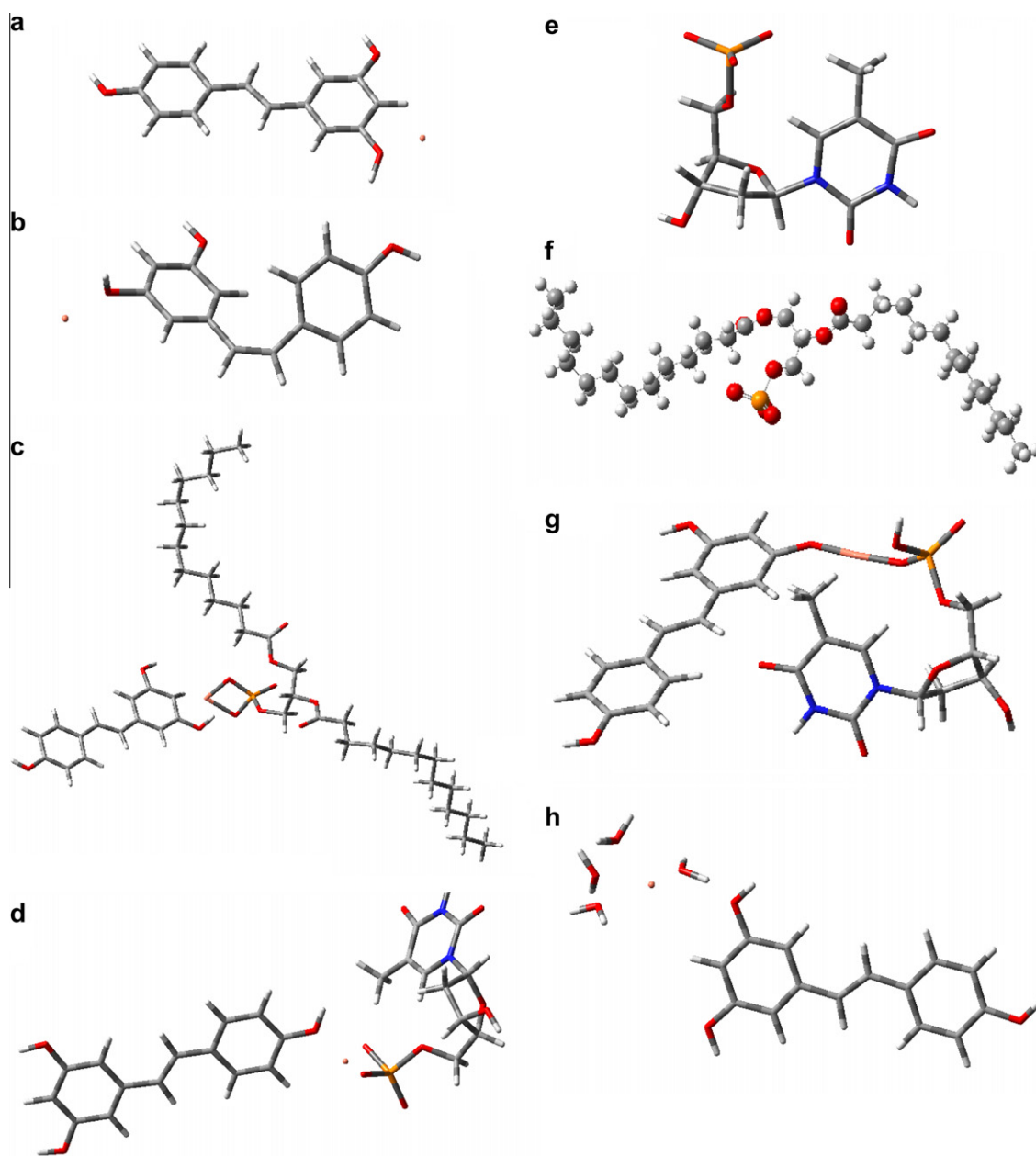


Fig. 6. The most stable optimised geometries of *trans*-resveratrol–Cu²⁺ (a) *cis*-resveratrol–Cu²⁺ (b), *trans*-resveratrol–Cu²⁺–phospholipid (c) *trans*-resveratrol–4'-O–Cu(II)–deoxythymidine 5'-monophosphate (d) at B3LYP/LANL2DZ level and deoxythymidine 5'-monophosphate at the B3LYP/6-311+G(d,p) level (e), phospholipid at the B3LYP/6-311+G(d,p) level (f), *trans*-resveratrol–3-O–Cu(II)–deoxythymidine 5'-monophosphate (g) and [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ (h) complexes optimised at the B3LYP/LANL2DZ level.

are 1.95 and 6.0 Å, respectively. This observation proves that the stability of the Cu(II)–O3 bond is higher than that of the Cu(II)–O5 bond in these complexed systems and that *trans*-resveratrol and its *cis*-stereoisomer form with Cu²⁺ the complexed systems in which O3 and O5 are donor atoms. It is interesting to note that in the most stable geometries of resveratrol stereoisomers–Cu(II) complexes, the Cu²⁺ ion does not lie in the surface of phenyl rings. Cu(II) ion in both complexes is located beneath the phenyl ring 1.42 Å away from the surface specified by the *trans*-stilbene skeleton. A close look at the optimised structures of the most stable resveratrol stereoisomers complexes with Cu(II) (structures **2b** and **2d**) reveals that these systems have chelated geometry. Since Frankel et al. claimed that *trans*-resveratrol is able to form chelate complexes with Cu(II), our results clearly confirm their observation.

Analysis of the optimised geometries of the most energetically stable aqua complexes shows that the Cu–O3 and Cu–O4' bonds are significantly longer than in the complexes which include free copper ion (II). This result demonstrates that water molecules contribute to the decrease in stability of these bonds. In particular, the optimised values of Cu–O3 and Cu–O5 bond lengths in the most stable geometry of [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ are 2.88 and 6.87 Å, respectively, and in [*cis*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ complex are 2.95 and 7.54 Å, respectively. However, the Cu–O4' bond length in [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ is 3.42 Å, while in [*cis*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ complex is 3.83 Å. These observations prove that in aqua complexes Cu(II) is stronger bonded with the O3 atom than with O4' atom resveratrol stereoisomers. Furthermore, the results obtained reveal that the average distance between Cu(II) and oxygen atom of water molecules in [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ and [*cis*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ is about 2.18 Å. Hence, we can conclude that water molecules strongly bond to copper ion (II). It should be stressed that in water medium all above-mentioned bond lengths are slightly shorter (by about 0.3 Å) than in vacuum. It proves that polar medium increases the stability of these bonds due to strong electrostatic interactions between this medium and the complexes.

A close look at the most stable geometries of [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ (Figs. 6h and 8b) and [*cis*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ complexes (Fig. 8d), in which Cu(II) coordinates to O3 atom indicates that water molecules form slightly deformed tetrahedral hydration shell, while in the most stable geometries of [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄–phospholipid]²⁺ (Fig. 9a) and [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄–deoxythymidine 5'-monophosphate]²⁺ (Fig. 10b) complexes this shell shows geometry strongly deviated from the tetrahedral shape. In our opinion, the presence of the negatively charged oxygen atoms of 5'-monophosphate group contributes to explanation of this result. It was found that in the most stable geometries of [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄–phospholipid]²⁺ and [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄–deoxythymidine 5'-monophosphate]²⁺ complexes Cu(II) ion is coordinated with the O3 atom of *trans*-resveratrol and two negatively charged oxygen atoms of 5'-monophosphate group. Analysis of the optimal distances between Cu(II) and negatively charged oxygens of deoxythymidine 5'-monophosphate and phospholipid indicates that in [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄–phospholipid]²⁺ and [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄–deoxythymidine 5'-monophosphate]²⁺ complexes these distances are significantly larger than in *trans*-resveratrol–Cu²⁺–phospholipid and *trans*-resveratrol–Cu²⁺–deoxythymidine 5'-monophosphate complexes. On the basis of this result we claim that in aqua complexes the presence of water molecules is related with decrease in stability of these bonds.

3.2. Energy analysis

The energy analysis (Table 2) reveals that all complexed systems including Cu²⁺ coordinated to O3 atom of resveratrol stereoisomers are more stable than those in which Cu²⁺ is coordinated to O4' atom. Besides, the *cis*-resveratrol–Cu²⁺ complexes are less

energetically stable than their *trans*-stereoisomeric equivalents. Therefore, these results demonstrate that *trans*-resveratrol is more disposed to bind Cu²⁺ than its *cis*-stereoisomer and that the O3 atom of stereoisomers studied is mainly responsible for the Cu²⁺ coordination. It should be stressed that the values of charges (Fig. 7) computed using Mulliken analysis, clearly indicate that O3 atom is more susceptible to bind Cu²⁺. As follows from the computations, the distribution of charge between O3 and O4' atoms of resveratrol stereoisomers is asymmetric due to the hyperconjugation effect. The main electronegative site at the O3 atom of resveratrol stereoisomer coincides with the preferred coordination site of Cu²⁺ to this atom. It should be emphasised that this asymmetric distribution is mainly noticeable in *trans*-resveratrol (Fig. 7a). On the basis of these results we can conclude that the presence of the 4'-OH group only facilitates the favourable coordination of Cu(II) to 3-OH group and formation stable chelate systems. Our results demonstrate that the 4'-OH is responsible for such charge distribution that explains the main contribution of the 3-OH group to formation of the chelate systems.

The B3LYP/LANL2DZ optimization yields the most stable conformations of *trans*-resveratrol–Cu²⁺–phospholipid and *trans*-resveratrol–Cu²⁺–deoxythymidine 5'-monophosphate complex in which Cu²⁺ is strongly coordinated to the negatively charged oxygen atoms of monophosphate group. The optimised values of the bond lengths between Cu²⁺ and the negatively charged oxygen of 5'-monophosphate group in *trans*-resveratrol–Cu²⁺–phospholipid and *trans*-resveratrol–Cu²⁺–deoxythymidine 5'-monophosphate complexes are 1.86 and 1.84 Å, respectively. However, the optimised values of the bond lengths between Cu²⁺ and oxygen atom of 4'-OH and 3-OH groups of *trans*-resveratrol are 1.93 and 1.84 Å, respectively. These values prove that the Cu(II)–O3 bond in these complexes is particularly stable. A closer look into the geometry of *trans*-resveratrol–Cu²⁺–phospholipid complex reveals

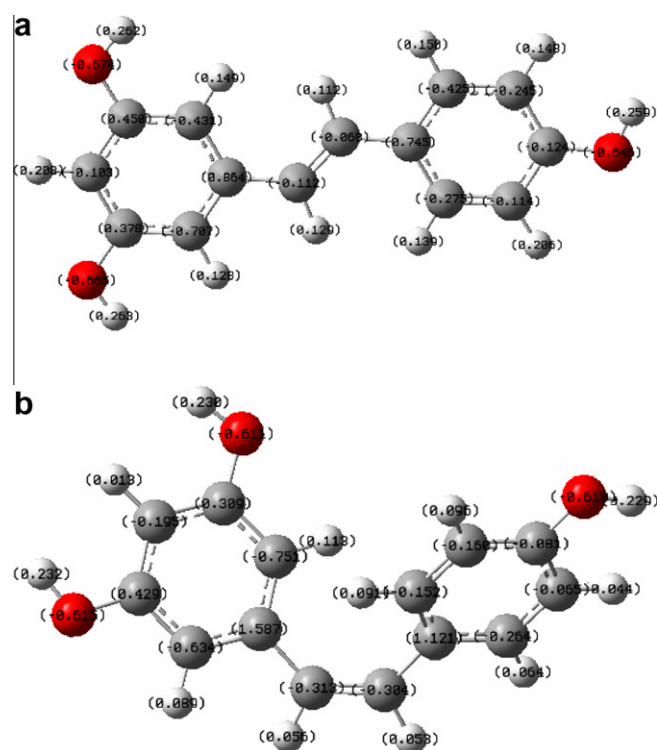


Fig. 7. The computed at the B3LYP/6-311++(3df,2pd) level Mulliken charge distribution in *trans*-resveratrol (a) and *cis*-resveratrol (b).

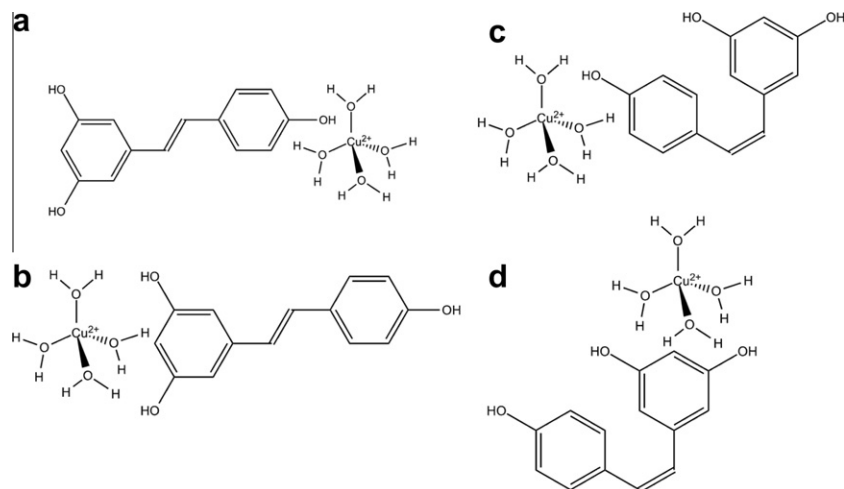


Fig. 8. Molecular structures of $[\text{trans-resveratrol-Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ (a and b) and $[\text{cis-resveratrol-Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ (c and d).

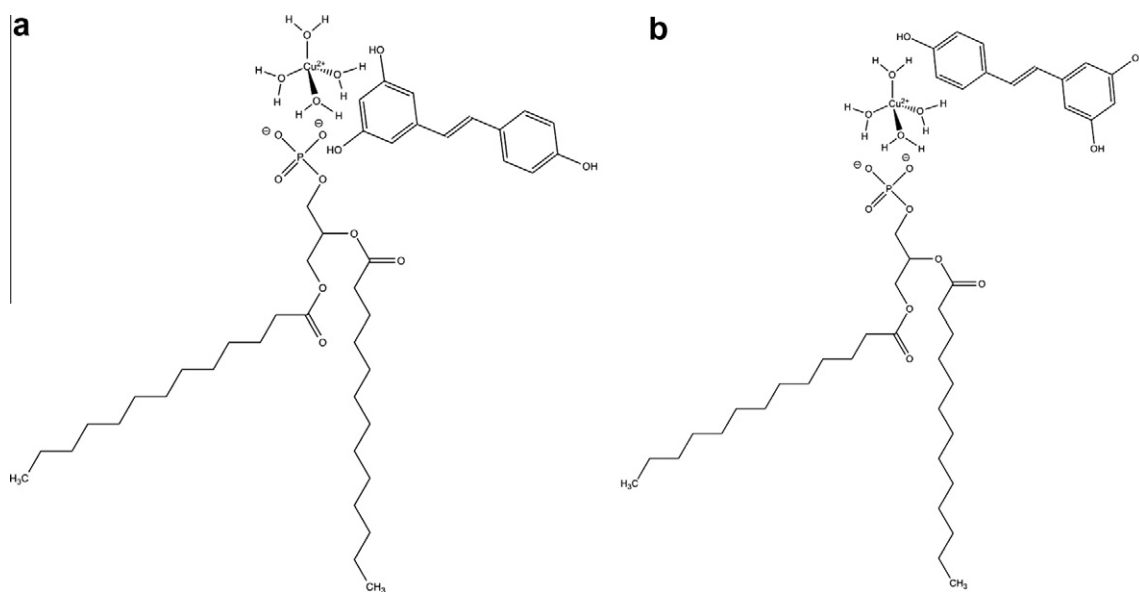


Fig. 9. Molecular structures of $[\text{trans-resveratrol-Cu}(\text{H}_2\text{O})_4\text{-phospholipid}]^{2+}$ complexes.

that phospholipid dianion functions as a ligand forming a chelate complex with Cu^{2+} , O3 and O5 oxygen atoms of *trans*-resveratrol. In this chelate complex, the negatively charged oxygens of monophosphate group and the O3 and O5 oxygen atoms of *trans*-resveratrol are donor atoms. Note that the most stable conformation of *trans*-resveratrol- Cu^{2+} -phospholipid is stabilised by one very stable hydrogen bond (1.60 Å) formed between H3 atom of *trans*-resveratrol and the negatively charged oxygen atom of monophosphate group.

The investigation of *trans*-resveratrol-3-O- $\text{Cu}(\text{II})$ complexes with deoxythymidine 5'-monophosphate reveals that in the most energetically stable conformation, the copper ion strongly bonded to negatively charged oxygen atoms of 5'-monophosphate group. It should be stressed that this conformation is more energetically stable than that of an analogous complex of *trans*-resveratrol-4'-O- $\text{Cu}(\text{II})$ complexes with deoxythymidine 5'-monophosphate. This result demonstrates that *trans*-resveratrol-3-O- $\text{Cu}(\text{II})$ complexes are characterised by the ability to form particularly stable molecular complexes with deoxythymidine 5'-monophosphate.

The interaction energies were computed for the geometries presented in Figs. 2–4 after their full optimization. Table 1 summarises the computed interaction energies, zero-point vibrational correction energies and basis set superposition correction energies. We have found that the inclusion of BSSE correction has minor importance for the binding energies, whereas the ZPVE correction is more important. As can be seen from the calculated values of the BSSE and ZPVE corrections, their contribution is more significant for aqua complexes. For the *trans*-resveratrol- Cu^{2+} -phospholipid and *trans*-resveratrol- Cu^{2+} -deoxythymidine 5'-monophosphate complexes the influence of BSSE corrections on the values of binding energies is particularly great. The overall data indicate that the complexes in which Cu^{2+} is coordinated to O3 or O5 atom of resveratrol stereoisomers have lower values of ΔE_{stab} than the ones in which Cu^{2+} is bound with O4' atom. This finding leads to the conclusion that these complexed systems are characterised by the most stable interaction of the Cu^{2+} binding with the O3 atom of stereoisomers. Comparing the values of ΔE_{stab} for stereoisomers we observe that *trans*-resveratrol- Cu^{2+} complexes are more stabilised than those of its *cis*-stereoisomer. Probably, the planar geometry of the *trans*-stilbene skeleton

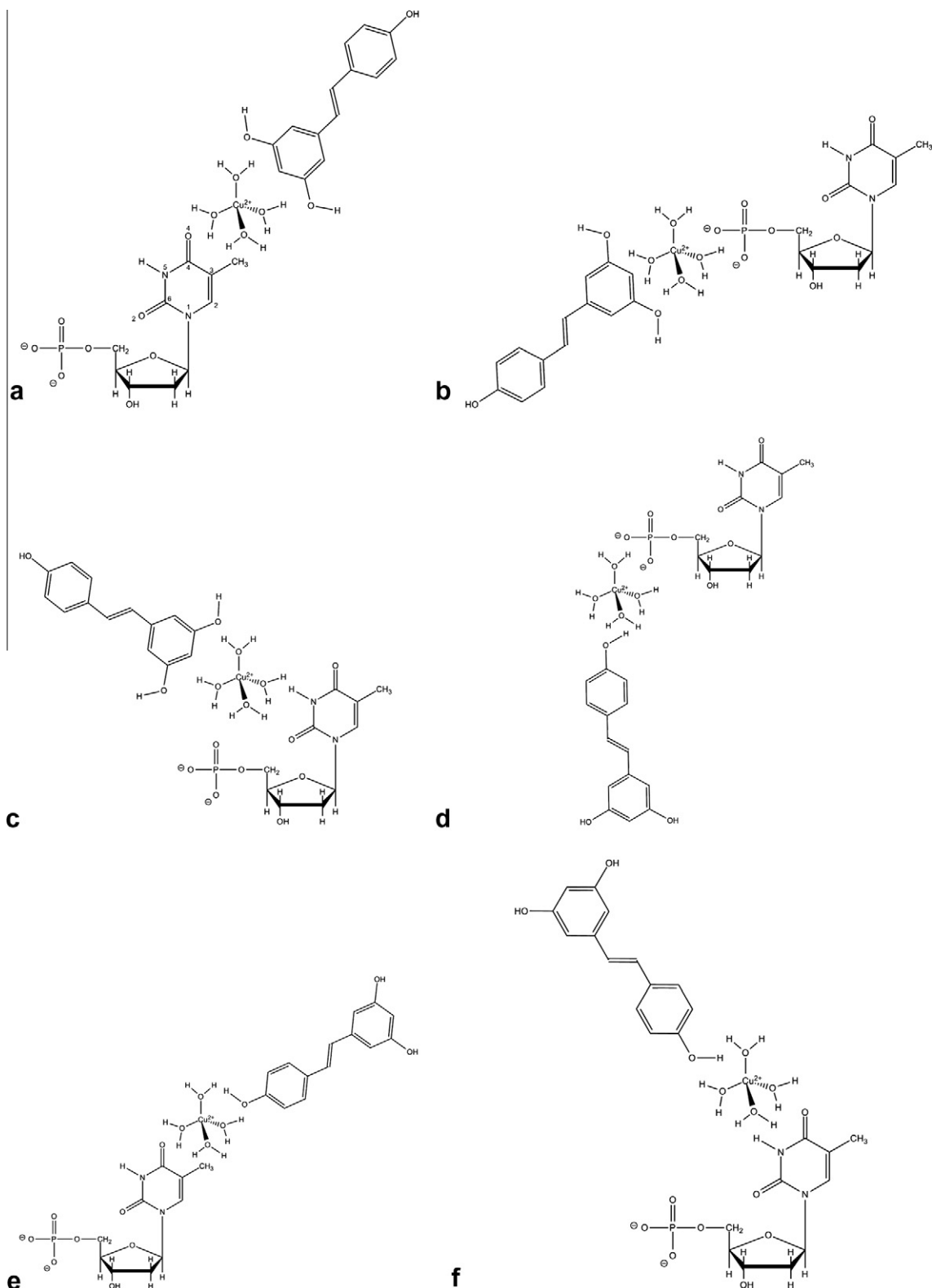


Fig. 10. Molecular structures of $[trans\text{-resveratrol-Cu(H}_2\text{O)}_4\text{-deoxythymidine 5'-monophosphate}]^{2+}$ complexes.

contributes to higher stabilisation of *trans*-resveratrol- Cu^{2+} than *cis*-resveratrol- Cu^{2+} . On the basis of the interaction energies of *trans*-resveratrol- Cu^{2+} -phospholipid and *trans*-resveratrol- Cu^{2+} -deoxythymidine 5'-monophosphate complexes we can conclude that the complexes in which Cu^{2+} binds to the negatively charged oxygens of monophosphate group and to O3 atom of *trans*-resvera-

trol are the most stabilised. This result is related to the chelate structure of these complexes and contributes to elucidation of the interaction of *trans*-resveratrol- Cu^{2+} complex with LDL particles and DNA. Besides, the semi-quinone geometry of *trans*-resveratrol in *trans*-resveratrol- Cu^{2+} -deoxythymidine 5'-monophosphate complex has great impact on stabilisation of this complex.

Table 1

The computed interaction energies $\Delta E_{\text{interact}}$ (kcal/mol), $\Delta E_{\text{interact}}$ with ZPVE (kcal/mol) and $\Delta E_{\text{interact}}$ with BSSE (kcal/mol) corrections for the complexes without water molecules in vacuum and water medium.

Complexes	$\Delta E_{\text{interact}}$ (vacuum)	$\Delta E_{\text{interact}}$ (water)	$\Delta E_{\text{interact}}$ with ZPVE (vacuum)	$\Delta E_{\text{interact}}$ with ZPVE (water)	$\Delta E_{\text{interact}}$ with BSSE (vacuum)	$\Delta E_{\text{interact}}$ with BSSE (water)
2a	−103.12	−120.65	−97.03	−114.75	−102.87	−118.56
2b	−105.10	−124.63	−98.15	−118.64	−104.65	−122.69
2c	−101.23	−118.09	−94.23	−109.43	−100.89	−116.89
2d	−102.56	−119.53	−95.24	−112.07	−101.97	−117.79
3a	−105.63	−124.98	−93.76	−114.46	−104.67	−122.86
3b	−100.75	−116.75	−90.54	−107.68	−99.34	−114.08
4a	−115.53	−132.97	−109.67	−126.38	−114.75	−130.76
4b	−120.43	−137.32	−116.78	−131.54	−119.12	−134.83
4c	−111.53	−128.64	−107.53	−125.45	−110.54	−126.18
4d	−118.14	−134.76	−115.01	−130.03	−117.93	−132.76
4e	−110.76	−127.32	−108.03	−124.99	−109.97	−124.97
4f	−114.38	−131.45	−111.60	−129.40	−113.54	−128.62

Table 2

The computed at the B3LYP/Lan12dz level in vacuum the total energies E of *trans*-resveratrol–Cu(II) and *cis*-resveratrol–Cu(II) complexes.

Complexed systems	E (hartree)
2a	−961.82380266
2b (chelate system)	−961.83652199
2c	−961.81136174
2d (chelate system)	−961.8217635

3.3. Energy analysis for aqua complexes

From the computations it is evident that the optimal coordination of the Cu(II) cation prefers four coordinated water molecules in the first hydration shell. For example, passing from 1 to 4 water molecule, the stabilisation energy of aqua–copper complexes is decreased by about 25 kcal/mol, while passing from 3 to 4 H₂O molecules ΔE_{stab} value decreases by 8.5 kcal/mol. The interaction energies computed according to Eqs. (1)–(3) for the most stable geometries of all aqua complexes are presented in Table 5. The results obtained reveal that from among the complexes with various number of coordinated water molecules, the most energetically preferable coordination involves four water molecules. The values of the ΔE_{stab} for the [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ and [*cis*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ complexes reveal that the [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ complex is more stable than [*cis*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ complex. This finding demonstrates that *trans*-resveratrol is more able to coordinate the [Cu(H₂O)₄]²⁺ aqua complex than *cis*-resveratrol. Moreover, we observe that the complexes in which Cu(II) is coordinated with the O3 atom of stilbene moiety are more stable than the other ones (Table 3).

A close look at the calculated values of ΔE_{stab} reveals that the presence of water molecules around the copper ion (II) is associated with dramatic increase in ΔE_{stab} for all aqua complexes investigated. This observation leads to the conclusion that the coordination of H₂O to Cu(II) contributes to decrease in stability

Table 3

The computed at the B3LYP/Lan12dz level in vacuum the total energies E of [*trans*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺ and [*cis*-resveratrol–Cu(H₂O)₄]²⁺.

Complexed systems	E (hartree)
8a	−1267.66231654
8b	−1267.68853812
8c	−1267.61223456
8d	−1267.63320089

of the aqua complexes studied. Strong electrostatic interactions between the copper ion (II) and water molecules are mainly responsible for the weak coordination of [Cu(H₂O)₄]²⁺ with *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol, phospholipid and deoxythymidine 5'-monophosphate. In addition, monopole–dipole character of these interactions enhances this effect. When water medium was taken into account, a significant influence of this medium on the ΔE_{stab} values was observed (Table 5). The values of this stability factor in water medium are dramatically lower than in vacuum. This result proves that in water medium all the complexed systems investigated are more stable than in vacuum and other nonpolar media.

3.4. *trans*-Resveratrol–Cu(II) complexes and their ability to inhibit the peroxidation of LDL

trans-Resveratrol has been reported to be an effective agent against the peroxidation of the low density protein (LDL). For the first time, Frankel et al. [10] have demonstrated that the inhibition of LDL oxidation by cupric ion can be attributed to this compound.

Table 4

The B3LYP/6-311++G(3df,2pd) optimised values of bonds lengths (Å), angles (deg) and total molecular energy (hartree and kcal/mol) of *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol.

Compound	<i>trans</i> -Resveratrol	<i>cis</i> -Resveratrol
<i>Parameter</i>		
O(4')–C(1)	1.364	1.365
O(3)–C(11)	1.365	1.367
O(5)–C(13)	1.365	1.367
O(4')–H(4')	0.962	0.961
O(3)–H(3)	0.961	0.961
O(5)–H(5)	0.961	0.961
C(7)–C(8)	1.342	1.342
C(4)–C(7)	1.460	1.468
C(8)–C(9)	1.463	1.473
C(2)–C(3)	1.388	1.383
C(1)–C(2)	1.391	1.393
C(10)–C(11)	1.389	1.387
C(12)–C(13)	1.387	1.392
C(5)–C(4)–C(7)–C(8)	0.00	31.53
C(7)–C(8)–C(9)–C(10)	0.00	39.36
C(2)–C(1)–O(4')–H(4')	0.00	0.00
C(10)–C(11)–O(3)–H(3)	0.00	0.00
C(14)–C(13)–O(5)–H(5)	0.00	0.00
O(4')–C(1)–C(2)	122.9	117.6
O(4')–C(1)–C(6)	117.5	122.7
O(3)–C(11)–C(10)	122.1	117.4
O(3)–C(11)–C(12)	116.6	121.9
O(5)–C(13)–C(12)	117.1	121.7
O(5)–C(13)–C(14)	122.1	117.3
Energy (hartree)	−766.649553	−766.639428
Energy (kcal/mol)	−481079.88	−481073.52

Table 5

The computed interaction energies $\Delta E_{\text{interact}}$ (kcal/mol), $\Delta E_{\text{interact}}$ with ZPVE (kcal/mol) and $\Delta E_{\text{interact}}$ with BSSE (kcal/mol) corrections for the aqua complexes studied in vacuum and water medium.

Complexes	$\Delta E_{\text{interact}}$ (vacuum)	$\Delta E_{\text{interact}}$ (water)	$\Delta E_{\text{interact}}$ with ZPVE (vacuum)	$\Delta E_{\text{interact}}$ with ZPVE (water)	$\Delta E_{\text{interact}}$ with BSSE (vacuum)	$\Delta E_{\text{interact}}$ with BSSE (water)
8a	–28.44	–45.36	–18.95	–34.75	–22.06	–38.52
8b	–30.53	–46.76	–21.43	–35.64	–23.14	–39.02
8c	–26.85	–43.53	–17.06	–31.95	–20.75	–36.32
8d	–27.09	–44.21	–17.77	–33.53	–21.40	–37.23
9a	–30.90	–49.98	–21.04	–35.84	–23.85	–42.44
9b	–25.75	–42.64	–16.34	–30.99	–19.36	–35.33
10a	–40.21	–61.62	–30.45	–50.49	–33.07	–54.27
10b	–46.56	–69.70	–35.03	–58.32	–39.80	–61.11
10c	–36.87	–55.52	–26.75	–44.77	–30.42	–48.44
10d	–43.76	–67.33	–33.24	–57.08	–36.92	–60.33
10e	–34.79	–50.56	–25.42	–39.22	–26.92	–43.42
10f	–39.76	–58.01	–30.02	–46.78	–31.74	–50.96

Further, Belguendouz et al. [11] have shown that *trans*-resveratrol has high capacity to bind the copper ion. Because this ion shows the ability to bind with protein moiety of LDL, the authors claim that *trans*-resveratrol can displace this ion forming redox inactive complexes. Moreover, their results evidence that *trans*-resveratrol is very efficient in protecting LDL against PUFA (polyunsaturated fatty acids) peroxidation. This effect could be assigned to the high ability of *trans*-resveratrol to chelate the copper ions acting as efficient pro-oxidant metal. Unfortunately, in their study the structure of the chelated structure of this complex has not been experimentally confirmed. On the basis of our results revealing that *trans*-resveratrol has high ability to form chelate complexes with Cu^{2+} we can conclude that *trans*-resveratrol can be a potent inhibitor of copper-dependent LDL oxidation. Hence, the strong binding of *trans*-resveratrol with copper ion can be responsible for this process and for removal of copper from LDL and arterial tissue. Additionally, the planar geometry of *trans*-resveratrol is of essential importance for binding of Cu^{2+} and LDL macromolecule.

It is well known that LDL as quasi-spherical particle that transports lipids in the blood has a highly-hydrophobic core consisting of polyunsaturated acids and esterified cholesterol molecules. This polyunsaturated acid is known as linolate acid. This core is surrounded by a polar shell of phospholipids and unesterified cholesterol molecules. Moreover, this polar coat contains single apolipoprotein B-100 which is identified by destination cells. Therefore, these facts suggest that *trans*-resveratrol–Cu(II) and [*trans*-resveratrol–Cu(H_2O) $_4$] $^{2+}$ complexes can bind with negatively charged oxygen atoms of 5'-monophosphate anion of phospholipids. It proves that *trans*-resveratrol–Cu(II) complex probably binds to the outer shell of LDL molecule in the living organisms. Summarizing, the results obtained prove that the inhibition of copper-catalyzed oxidation LDL by *trans*-resveratrol can be correlated to its ability to bind Cu^{2+} and that the complexes formed have chelated structure.

4. Conclusions

The interactions of the Cu^{2+} ion and [$\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_{1-4}$] $^{2+}$ aqua complex with resveratrol stereoisomers and the interactions of *trans*-resveratrol– Cu^{2+} complex with dianion of phospholipid and deoxythymidine 5'-monophosphate in vacuum and water medium were studied. The computations performed reveal that *trans*-stilbene skeleton in all systems studied is strictly planar, hence this geometry ensure favourable interactions of *trans*-resveratrol–Cu(II) complexes with deoxythymidine 5'-monophosphate and phospholipid. The results imply that *trans*-resveratrol– Cu^{2+} complexed systems are more stabilised than *cis*-resveratrol– Cu^{2+} ones and that the complexes with 3-O–Cu(II) bond are especially stable. Our study has shown that the ability of *trans*-resveratrol to inhibit

copper-dependent LDL peroxidation can be attributed to a significant ability of *trans*-resveratrol to coordinate Cu^{2+} . The results demonstrate that the ability of *trans*-resveratrol to form stable *trans*-resveratrol– Cu^{2+} –phospholipid and *trans*-resveratrol– Cu^{2+} –deoxythymidine 5'-monophosphate complexes contributes to understanding the interaction of *trans*-resveratrol– Cu^{2+} complexes with LDL particles and DNA of cancer of cells. It was shown that water molecules which were coordinated to Cu(II) significantly reduce the stability of all the complexed systems considered. Additionally, the computations revealed that in water medium the components of the complexes are stronger bonded than in vacuum. Therefore, this medium is responsible for increase in stability of the chemical systems studied. The findings obtained satisfactorily explain the experimental data and give insight into understanding of therapeutical and biological activity of *trans*-resveratrol– Cu^{2+} complexes. We hope that this study will initiate theoretical investigation of interactions of *trans*-resveratrol with other biomolecules and enzymatic systems and that our results will motivate experimenters to further investigation of interaction of *trans*-resveratrol–Cu(II) complexes with LDL and DNA.

Acknowledgements

This study is supported by a Grant No. 60 “Investigations of the biophysical and chemical properties of *trans*-resveratrol” from Supercomputer Center in Poznań. We are very indebted to MSc. Maria Sychalska and Ph.D. Piotr Stępień for linguistic assistance. Authors are also grateful to Professor Jerzy Konarski and Małgorzata Szeląg for stimulating discussions and valuable instructions.

References

- [1] M. Jang, L. Cai, G.O. Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W.W. Beecher, H.H. Fong, N.K. Farnsworth, A.D. Kinghorn, R.G. Mehta, R.C. Moon, J.M. Pezutto, *Science* 273 (1997) 218.
- [2] A.A. Bertilli, L. Giovannini, D. Gianessi, M. Migliori, W. Bernini, M. Fregoni, A. Bertilli, *Int. J. Tissue React.* 17 (1995) 1.
- [3] F. Uenobe, S. Nakamura, M. Miyazama, *Mutat. Res.* 373 (1997) 197.
- [4] O. Brede, S. Stojanovic, H. Spritz, *Free Radic. Res.* 36 (2002) 76.
- [5] M.H. Aziz, R. Kurnar, N. Ahmad, *Int. J. Oncol.* 23 (2003) 17.
- [6] F. Orallo, E. Alvarez, M. Carnina, J.M. Leiro, E. Gomez, P. Fernandez, *Mol. Pharmacol.* 61 (2004) 294.
- [7] L.M. Szewczuk, L. Forti, L.A. Stivala, T.M. Penning, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 22727.
- [8] M. Fontecave, M. Lepoivre, E. Elleingang, C. Gerez, O. Guittet, *FEBS Lett.* 421 (1998) 277.
- [9] N.J. Sun, S.H. Woo, J.M. Cassidy, R.M. Snapka, *J. Nat. Prod.* 61 (1998) 362.
- [10] E.N. Frankel, A.L. Waterhouse, J.E. Kisella, *Lancet* 341 (1993) 1103.
- [11] L. Belguendouz, L. Fremont, A. Linard, *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997) 1347.
- [12] K. Fukuhara, N. Miyata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 3187.
- [13] K. Fukuhara, M. Nagakawa, I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Imai, S. Urano, S. Fukuzumi, T. Ozawa, N. Ikota, M. Mochizuki, N. Miyata, H. Okuda, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 1437.

- [14] A.S. Azmi, S.H. Bhat, S.M. Hadi, FEBS Lett. 579 (2005) 3131.
- [15] J.V. Burda, M.K. Shukla, J. Leszczyński, J. Mol. Model. 11 (2005) 362.
- [16] J.V. Burda, M. Pavelka, M. Šimánek, J. Mol. Struct. (THEOCHEM) 683 (2004) 183.
- [17] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Roob, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Menucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Ciosłowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian 03 (Revision C.02), Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.
- [18] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Phys. Rev. B 37 (1988) 785.
- [19] F.B. Vanduijneveldt, J.G.C.M. Van Duijneveldt-Vande Rijdt, J.H. Van Lenthe, Chem. Rev. 94 (1994) 36.
- [20] S.F. Boys, F. Bernard, Mol. Phys. 19 (1970) 553.
- [21] A. Klamt, G. Schürmann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 (1993) 799.
- [22] F. Caruso, J. Tanski, A. Villegas-Estrada, M. Rossi, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 7279.
- [23] D. Mikulski, R. Górniak, M. Molski Europ. J. Med. Chem. 45 (2010) 1027.
- [24] D. Mikulski, M. Molski Europ. J. Med. Chem. 45 (2010) 2366.
- [25] D. Mikulski, M. Szeląg, M. Molski, R. Górniak, J. Mol. Struct. (THEOCHEM) 951 (2010) 37.